



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
كلية العلوم الطبيعية والحياة

Département : Biologie Appliquée

قسم: البيولوجيا التطبيقية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie microbienne

Spécialité : Biotechnologie et Biothérapie

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Essai d'isolement des bactéries marines
productrices d'enzymes à partir du littoral de
Sidi Abdelaziz, wilaya de (Jijel).**

Présentées par : Meghlaoui Hadjer

Le :22/06/2025

Bouchrikha Darine

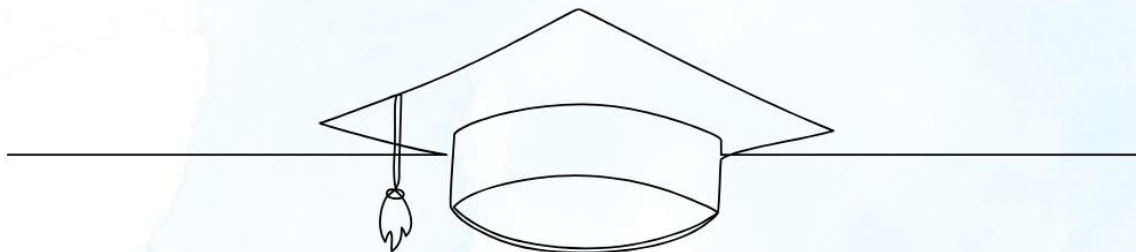
Jury d'évaluation :

Président : Pr. Bellil Ines (Pr- Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Encadrant : Dr. Adjeroud Moussa (MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Examinatrice : Dr. Baali Nacera (MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Année Universitaire 2024/2025



REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je rends grâce à Allah, le Tout-Puissant et le Clément, pour m'avoir donné la santé, la patience et la force nécessaires afin de mener à bien ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon encadrant, Monsieur **Moussa Adjroud**, Maître de conférences classe A à l'université de Constantine 1, pour son encadrement rigoureux, ses orientations précieuses et son accompagnement constant tout au long de ce mémoire. Sa disponibilité et ses conseils ont grandement contribué à l'aboutissement de ce projet.

Je remercie sincèrement Madame **Bellil Ines**, Professeur à l'université Frères Mentouri, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance, ainsi que Madame **Baali Nacera**, Maître de conférences catégorie A à l'université de Constantine 1, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'évaluer ce travail. Son regard bienveillant et critique est pour moi d'une grande valeur.

Mes remerciements vont également aux ingénieures du laboratoire de microbiologie générale, Mesdames **Dekkiche Bisma Anfel** et **Lakroune Ratiba**, pour leur aide technique, leur gentillesse et leur disponibilité tout au long de mes manipulations.

Je n'oublie pas de remercier le personnel administratif de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, en particulier ceux du département de biologie appliquée, et notamment Madame **Hassia**, pour leur soutien au quotidien.

Enfin, mes sincères remerciements vont à l'ensemble des enseignants de la spécialité Biotechnologie et Biothérapie, notamment **Monsieur Kacem Chaouche** pour la qualité de leur enseignement et leur dévouement.



Dédicace

À celle qui a semé en moi l'amour du savoir,
à celle qui a veillé des nuits entières pour moi,
à ma chère mère Amel Bekhouche,
aucun mot de gratitude ne saurait exprimer tout ce que je te dois.
Je prie Dieu de te préserver, de t'accorder la santé et de te récompenser pour tout ton amour et
tes sacrifices.

À mon père bien-aimé Abdelali,
modèle de persévérance et de travail acharné,
merci pour ton soutien indéfectible et ta confiance constante.
Ton accompagnement m'a toujours portée dans les moments décisifs.

À mes chers frères Teissir, Bidad et Mouayed,
merci pour votre présence à mes côtés et votre soutien sincère.
Votre affection a été un véritable appui tout au long de ce parcours.

À ma grand-mère bien-aimée Boukhtota Mesaouda,
merci pour tes prières et tes mots pleins d'espoir,
qui m'ont tant réconfortée et encouragée.

À mes tantes maternelles et mes oncles,
je vous exprime ma profonde reconnaissance pour votre amour et votre appui constants.
Votre présence m'a toujours réchauffé le cœur.

À mes cousines,
merci pour votre tendresse, votre écoute et votre soutien tout au long de mon chemin.
Vous avez toujours su me faire sentir entourée et soutenue.

Mr L je te remercie chaleureusement pour ta patience, ton encouragement constant et ton
regard positif sur les choses.

Ta sagesse, ton humour et ton appui m'ont souvent redonné courage et clarté.

Ta présence a été un véritable pilier dans ce parcours.

À mes précieuses amies Mouna, Hadil, Romaissa, Kawther, Narimane, Hanine et Madjeda,
merci pour votre belle amitié, votre soutien moral et votre énergie positive,
vous avez rendu ce voyage académique plus doux et plus lumineux.

À Hadjer meghlaoui
je tiens à exprimer toute ma gratitude pour ton aide précieuse dans la réalisation de ce
mémoire,
que ce soit sur le plan technique ou dans la préparation concrète.
Ton implication m'a été d'un grand secours. Merci du fond du cœur.

À toutes celles et ceux qui, par une parole gentille, une prière sincère ou un simple geste
de soutien,

ont contribué à mon avancée,
je vous adresse mes plus sincères remerciements.



DARINE



Dédicace

À ma douce mère Dahli Fatima,
source inépuisable d'amour, de patience et de sagesse,
pour tous les sacrifices silencieux, les prières du cœur et les nuits d'inquiétude,
je te dois tout. Que Dieu te comble de santé et de sérénité.

À mon père Saleh,
l'homme de ma vie, mon roc dans la tempête,
merci pour ton amour constant, ton écoute et ton soutien sans faille.

Ta présence a illuminé chaque étape de ce voyage.
À mes frères et sœurs Amira, Chiraz, Nihal et Nabil,
homme de principes, d'efforts et de droiture,
merci pour ton soutien inébranlable et ta foi en moi,
tu as toujours été une force tranquille dans mon parcours.

À Merabeta Mouhamed Ridha,
merci pour votre affection sincère et votre soutien précieux.
Votre complicité m'a portée bien plus que vous ne pouvez l'imaginer.
À mes chères amies Marwa, Inès, Nouha et Nour El Houda,
vous avez apporté lumière, rires et courage tout au long de ce chemin.
Merci pour votre loyauté, votre gentillesse et votre présence réconfortante.

À Darine Bouchrikha,
ta générosité et ton aide précieuse ont été essentielles dans l'élaboration de ce mémoire.
Merci pour ta disponibilité et ton engagement sincère. Je t'en suis profondément
reconnaissante.

Enfin, à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin,
par un geste, une pensée, une prière ou une parole,
je vous adresse mes remerciements les plus sincères.

HADJER



RESUME

Dans le cadre de la valorisation des ressources microbiologiques marines, ce travail s'est concentré sur l'isolement et la caractérisation de bactéries marines productrices d'enzymes hydrolytiques. Ces micro-organismes, adaptés aux milieux salins, constituent une source précieuse d'enzymes stables et efficaces dans des conditions environnementales extrêmes.

Des prélèvements d'eau et de sédiments ont été réalisés sur le littoral de Sidi Abdelaziz (Jijel), puis ensemencés sur différents milieux de culture (gélose nutritive, TSA et milieu marin naturel). Seize souches bactériennes ont été isolées, purifiées et analysées morphologiquement (macroscopie, microscopie, coloration de Gram) et testés pour la production d'enzymes (protéases, amylases, lipases).

Les résultats ont révélé que plusieurs de ces souches présentent une activité enzymatique significative, notamment amylolytique. L'identification biochimique à l'aide de la galerie API 20 E a permis de relier certaines souches à des genres marins connus.

Mots-clés : Bactérie Marines, Enzymes hydrolytique , Isolement bactérien ,Activité enzymatique,Galerie API 20 E .

الملخص

في إطار تثمين الموارد الميكروبيولوجية البحرية، ركز هذا العمل على عزل وتوصيف بكتيريا بحرية منتجة للإنزيمات التحليلية. هذه الكائنات الدقيقة، المنكيفة مع البيئات المالحة، تشكل مصدرًا ثمينًا للإنزيمات المستقرة والفعالة في الظروف البيئية القاسية.

تم جمع عينات من المياه والرواسب من ساحل سيدي عبد العزيز (جيجل)، ثم زرعت على أوساط غذائية مختلفة تم عزل وتنقية ستة عشر سلالة بكتيرية، ثم خضعت لتحاليل مورفولوجية (ملاحظة شكلية ومجهريّة وتلوين غرام) واختبارات إنزيمية (بروتياز، أميلاز، ليباز).

أظهرت النتائج أن العديد من هذه السلالات أبدت نشاطًا إنزيميًا ملحوظًا. سمحت التحاليل البيوكيميائية باستخدام نظام API 20E بربط بعض السلالات بأجناس بحرية معروفة. تؤكد هذه النتائج على الإمكانات الكبيرة للساحل الجزائري كمصدر للإنزيمات البحرية ذات القيمة العالية، والتي يمكن استغلالها في مجالات صناعية متعددة مثل المنظفات، والصناعات الغذائية، والمعالجة الحيوي.

الكلمات المفتاحية:

البكتيريا البحرية، الإنزيمات التحليلية، عزل البكتيريا، النشاط الإنزيمي، مجموعة اختبار API 20 E.

Abstract

As part of the valorization of marine microbiological resources, this study focused on the isolation and characterization of marine bacteria producing hydrolytic enzymes. These microorganisms, adapted to saline environments, represent a valuable source of stable and efficient enzymes under extreme environmental conditions.

Water and sediment samples were collected from the Sidi Abdelaziz coast (Jijel) and cultured on various media (nutrient agar, TSA, and natural marine medium). Sixteen bacterial strains were isolated, purified, and subjected to morphological analyses (macroscopy, microscopy, Gram staining) as well as enzymatic tests (proteases, amylases, lipases).

The results showed that several of these strains exhibited significant enzymatic activity, particularly amylolytic. Biochemical identification using the API 20 E system linked some strains to well-known marine genera such as *Vibrio* and *Bacillus*. These findings highlight the potential of the Algerian coastline as a reservoir of high-value marine enzymes, suitable for exploitation in various industrial fields, including detergents, food processing, and bioremediation.

Keywords: Marine Bacteria, Hydrolytic Enzymes, Bacterial Isolation, Enzymatic Activity, API 20 E Gallery.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

Dédicace

RESUME

SOMMAIRE

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des abréviations

Introduction Générale..... 1

Première partie : __SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 01 : Les Environnements Marins

1.Les Environnements Marins 4

1.1 Définition..... 4

1.2 Paramètres physico-chimiques des milieux marins..... 4

1.3 Zones marines propices à la diversité microbienne..... 5

1.3.1 Récifs coralliens et estuaires 5

1.3.2 Sédiments marins et biofilms benthiques 5

1.3.3 Zones de remontée d'eau froide et sources hydrothermales..... 6

1.4 Environnements marins extrêmes et intérêt biotechnologique..... 6

1.4.1 Définition des milieux extrêmes marins (fumeurs hydrothermaux, zones polaires) 7

1.4.2 Bactéries extrémophiles et leurs propriétés adaptatives 8

1.4.3 Applications biotechnologiques des enzymes extrêmes..... 8

Chapitre 02 :Les Bactéries Marines 9

2.Les Bactéries marines 9

2.1 Définition et caractéristiques morphologiques et physiologiques..... 9

2.1.1 Morphologie des bactéries marines 9

2.1.2 Adaptations physiologiques..... 9

2.1.3 Mécanismes de résistance et de survie 10

2.2 Classification des bactéries marines 10

2.2.1 Bactéries halophiles..... 10

2.2.2 Psychrophiles et psychrotrophes marines..... 11

2.2.3 Thermophiles marines 11

2.3 Adaptations des bactéries marines aux environnements extrêmes 11

2.3.1 Adaptation membranaire 11

2.3.2 Adaptation des protéines 12

2.3.3 Adaptation enzymatique	12
2.3.4 Adaptation au stress oxydatif	13
2.3.5 Adaptation à la pression hydrostatique.....	13
2.4 Intérêts écologiques et biotechnologiques des bactéries marines.....	13
Chapitre 03 :Les Enzymes Microbiennes.....	15
3. Les enzymes microbiennes.....	15
3.1 Définition d'une enzyme	15
3.1.1 Généralité	15
3.1.2 Mécanisme d'action enzymatique	15
3.1.3 Caractéristiques des enzymes	15
3.1.4 Classification enzymatique.....	16
3.1.5 Spécificité des enzymes microbiennes marines.....	16
3.2 Catégories enzymatiques produites par les bactéries marines	17
3.2.1 Amylases	17
3.2.2 Protéases	17
3.2.3 Lipases.....	18
3.2.4 Cellulases.....	18
3.2.5 Chitinases	18
3.2.6 Esterases, DNases et autres hydrolases	18
3.3 Facteurs influençant la production enzymatique	19
3.4 Caractéristiques des enzymes marines	20
3.4.1 Thermostabilité.....	20
3.4.2 Halotolérance.....	20
3.4.3 Psychrotolérance (activité à basse température).....	20
3.4.4 Barotolérance.....	21
3.4.5 Tolérance aux solvants organiques.....	21
3.5 Applications biotechnologiques et industrielles des enzymes marines	21
3.5.1 Industrie pharmaceutique	21
3.5.2 Industrie agroalimentaire.....	21
3.5.3 Environnement et bioremédiation	22
3.5.4 Industrie textile et papetière	22
3.5.5 Bioénergie et valorisation des déchets	22
3.5.6 Cosmétique et soins dermatologiques	22
<hr/>	
Deuxième partie : PARTIE EXPERIMENTALE	
1.Description du site d'échantillonnage.....	24
1.1 Localisation géographique.....	24

1.2 Conditions physico-chimiques	24
2. Échantillonnage	25
3. Isolement, purification et conservation des souches	25
3.1 Préparation des échantillons	25
3.2 Ensemencement sur milieux non sélectifs	26
3.3 Incubation et conditions de culture	26
3.4 Purification des isolats	27
3.5 Méthodes de conservation	27
4. Caractérisation morphologique et évaluation enzymatique	27
4.1 Coloration de Gram	27
4.2 Détection des activités enzymatiques extracellulaires	28
4.2.1 Activité protéolytique	28
4.2.2 Activité amylolytique	29
4.2.3 Activité lipolytique	29
5. Identification biochimique (à l'aide de la galerie API20)	30
Résultats et Discussions	34
1. Résultats et Discussions	35
1.1 .Isolement ,purification et conservation des souches :	35
1.1.1. Préparation et ensemencement des échantillons	35
1.1.2. Conditions d'incubation	37
1.1.3. Purification des isolats	37
2. Observation des résultats de la coloration de Gram :	42
3. Détection des activités enzymatiques extracellulaires	46
3.1 Activité protéolytique	47
3.2 Activité amylolytique	47
3.3 Activité lipolytique	47
4. Identification par galerie API 20 E :	50
Conclusion	58
Les Références Bibliographiques	60
Les Références	61
Les Annexes	62

Liste des Tableaux

Tableau 1 : : Intérêts écologiques et biotechnologiques des bactéries marines.....	14
Tableau 2 : : Facteurs influençant la production enzymatique.	19
Tableau 3 : Les résultats de la purification	38
Tableau 4 : Résultats de la coloration de Gram pour les 16 souches bactériennes marines isolées.....	43
Tableau 5 : Activité protéolytique observées chez les souches bactériennes marines isolées.....	47
Tableau 6 : Activité amylolytique observées chez les souches bactériennes marines isolées.....	47
Tableau 7 : Activité lipolytique des 16 souches bactériennes isolées	48
Tableau 8 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA4.	50
Tableau 9 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA5.	51
Tableau 10 : : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA7	52
Tableau 11 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA6.	53
Tableau 12 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA14	54
Tableau 13 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA16.	55

Liste des Figures

Figure 1 : Diversité des coraux dans un récif, habitat propice aux communautés microbiennes symbiotiques (Bourne, 2016)	5
Figure 2 : Image en tomographie 3D d'un biofilm microbien (en violet) isolé de sédiments marins, illustrant la structure complexe des communautés microbiennes benthiques (Guilherme Silva et al., 2017)	6
Figure 3 : Les sources hydrothermales (Bris, 2019)	7
Figure 4 : Communauté microbienne dense autour d'une cheminée hydrothermale profonde, illustrant la vie extrêmophile adaptée à des conditions physico-chimiques extrêmes. (Bris, 2019)	7
Figure 5 : Les différentes formes de bactéries.	9
Figure 6 : Les mécanismes de l'action enzymatique	15
Figure 7 : Classification des enzymes	16
Figure 8 : Zone de prélèvement	24
Figure 9 : : A) Photographie de l'échantillon prélevé B) Appareil de mesure du pH (pH-mètre)	25
Figure 10 : Photos des milieux utilisés	26
Figure 11 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20E	32
Figure 12 : Photo de l'interface du logiciel UPBM Le Lab API.	33
Figure 13 : Photo des colonies isolées sur le milieu TSA.	36
Figure 14 : Photo des colonies isolées sur le milieu GN.	36
Figure 15 : Photo des colonies isolées sur le milieu naturel MN	37
Figure 16 : Photographie générale montrant l'ensemble des lames colorées après coloration de Gram.	44
Figure 17 : Micrographies représentatives des 16 souches bactériennes isolées après coloration de Gram.	46
Figure 18 : : Halos clairs visibles autour des souches bactériennes, révélant une activité enzymatique extracellulaire spécifique	49
Figure 19 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA4.	50
Figure 20 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA5	51
Figure 21 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA7.	52
Figure 22 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA6.	53
Figure 23 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA14	54
Figure 24 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA16.	55

Liste des abréviations

pH : potentiel hydrogène
ADN : acide désoxyribonucléique
PCR : réaction en chaine par polymérase
EPS : exo polysaccharides
LPS : lipopolysaccharides
PHA : polyhydroxyalcanoates
GN : gélose nutritive
TSA : gélose trypto-caséine soja
MN : milieu naturel
G- : Gram négatif
G+ : Gram positif
PCR : Réaction en chaine par polymérase
°C : Degré Celsius
µm : Micromètre
CO : Monoxyde de carbone
D : Distace
Min : Minute
S : Seconde
ml : Millilitre
T : Température
O2 : Oxygène
Cm : Centimètre
µs : Micro simens
API : Analytique Prophylactic Index
CIT : Citrate
VP : Voges Proskawer
GEL : Gélatine (origine bovine)
ADH : Arginine dihydrolase
LDC : Lysine Décarboxylase
ODC : Ornithine Décarboxylase

URE : Uréase

ONPG : Ortho –Nitrophényle-B-D-Galactosidase

H2O : Sodium thiosulfate

TDA : Tryptophane Désaminase

IND : Indole

IUBMB : Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire

GLU : Glucose

MAN : Mannitol

INO : Inositol

SOR : Sorbitol

RHA : Rhamnose

SAC : Saccharose

MEL : Melibiose

AMY : Amygdaline

ARA : Arabinose

Introduction Générale

Introduction Générale

Les environnements marins, qui couvrent près de 71 % de la surface du globe, constituent l'un des plus vastes réservoirs de biodiversité microbienne au monde. Ces milieux, souvent extrêmes en raison de conditions telles que des pressions hydrostatiques élevées, des températures très variables, une salinité fluctuante et une faible disponibilité en nutriments, abritent une multitude d'organismes extrêmophiles. Ces micro-organismes ont développé des mécanismes adaptatifs remarquables, notamment la production d'enzymes exceptionnellement robustes, désignées sous le terme d'extrêmozymes (Zhang et Kim, 2010a)

Ces extrêmozymes se distinguent par leur capacité à maintenir une activité catalytique efficace dans des conditions hostiles : températures extrêmes, milieux hypersalins, pH acides ou bas, et fortes pressions. Grâce à ces propriétés, elles suscitent un intérêt croissant dans divers domaines industriels tels que la bioremédiation, l'agroalimentaire, la pharmacie, les cosmétiques, la chimie verte et la production de bioénergie. Leur aptitude à catalyser des réactions spécifiques là où les enzymes conventionnelles échouent ouvre de nouvelles perspectives pour le développement de procédés industriels plus durables et plus performants (Trincon et Antonio, 2011).

Parmi les classes enzymatiques marines les plus étudiées figurent les hydrolases, notamment les protéases, lipases, amylases, cellulases, chitinases et alginate lyases. Ces enzymes possèdent des caractéristiques biochimiques remarquables, telles que la thermostabilité, l'halotolérance et la tolérance à des pH extrêmes, ce qui les rend parfaitement adaptées aux environnements industriels exigeants. Leur exploitation permet d'optimiser les procédés industriels tout en réduisant l'impact environnemental, dans une logique de transition vers une chimie plus verte.

En Algérie, bien que le littoral méditerranéen regorge d'une biodiversité marine encore peu exploitée, les recherches sur les enzymes d'origine bactérienne marine demeurent rares. La plage de Sidi Abdelaziz, située dans la wilaya de Jijel, offre un site écologique particulièrement favorable à l'isolement de bactéries marines potentiellement productrices d'extrêmozymes, ce qui en fait un lieu d'étude stratégique pour l'exploration de nouvelles ressources enzymatiques locales.

Dans cette optique, la présente recherche a pour objectifs d'isoler et de cultiver des bactéries marines à partir d'échantillons prélevés sur le site de Sidi Abdelaziz, de caractériser leurs

propriétés morphologiques et biochimiques, d'évaluer leur activité enzymatique extracellulaire (protéases, amylases, lipases), et enfin, d'identifier les souches présentant un potentiel d'exploitation biotechnologique. Ce travail vise à enrichir les connaissances sur la biodiversité microbienne marine algérienne, tout en ouvrant la voie à une valorisation durable de ces ressources dans des applications industrielles innovantes (A. Trincone, 2011)

Première partie :
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 01 : Les Environnements Marins

1. Les Environnements Marins

1.1 Définition

Les environnements marins désignent l'ensemble des milieux aquatiques salés qui couvrent environ 71 % de la surface terrestre, incluant les océans, les mers, ainsi que des zones spécifiques telles que les estuaires, les lagunes, les marais salants, les récifs coralliens et les abysses (M.C Austen et al., 2007). Ces milieux constituent le plus vaste écosystème de la planète, abritant une biodiversité remarquable et jouant un rôle crucial dans la régulation des cycles biogéochimiques et des équilibres climatiques globaux (M.C Austen et al., 2007).

Sur le plan écologique, les environnements marins se caractérisent par une grande hétérogénéité spatiale et temporelle, liée aux variations de paramètres physico-chimiques tels que la salinité, la température, la pression, le pH et la disponibilité en nutriments (Giovannelli et al., 2020). Cette diversité crée de nombreuses niches écologiques favorisant le développement de communautés microbiennes spécialisées, souvent adaptées à des conditions extrêmes, comme celles rencontrées dans les zones hydrothermales ou hypersalines (Giovannelli et al., 2020).

Par ailleurs, ces milieux marins représentent d'importants réservoirs biologiques et génétiques. Les micro-organismes marins, notamment les bactéries, possèdent des capacités métaboliques uniques qui leur permettent de survivre dans des environnements hostiles, ce qui suscite un intérêt croissant en biotechnologie. En effet, ces microbes sont capables de produire des enzymes actives dans des conditions extrêmes, ouvrant ainsi des perspectives innovantes dans les domaines industriel, pharmaceutique et environnemental (Yuan et al., 2022).

Ainsi, la compréhension des environnements marins nécessite une approche multidisciplinaire qui va au-delà de leur simple description géographique, en intégrant leur dynamique écologique, leur rôle dans la biosphère et leur potentiel biotechnologique.

1.2 Paramètres physico-chimiques des milieux marins

Les environnements marins sont caractérisés par une grande diversité de paramètres physico-chimiques qui influencent directement la composition, la distribution et l'activité des organismes qui y vivent. Parmi ces paramètres, la température, la salinité, la pression, le pH et la disponibilité en nutriments jouent un rôle fondamental dans la structuration des communautés microbiennes et la dynamique des écosystèmes marins (Azam et Malfatti, 2007).

Ces paramètres combinés créent une mosaïque de niches écologiques favorisant la diversité microbienne et des adaptations métaboliques uniques, notamment la production d'enzymes actives dans des conditions extrêmes (Chatterjee et *al.*, 2022) .

1.3 Zones marines propices à la diversité microbienne

La diversité microbienne marine est fortement influencée par les caractéristiques spécifiques des différents habitats marins. Certaines zones, telles que les récifs coralliens, les estuaires, les sédiments benthiques, ainsi que les zones de remontée d'eau froide et les sources hydrothermales, offrent des conditions favorables à une biodiversité microbienne élevée et à des fonctions écologiques majeures.

1.3.1 Récifs coralliens et estuaires

Les récifs coralliens sont des écosystèmes complexes qui abritent une grande diversité microbienne. Ces communautés microbiennes jouent un rôle crucial dans la santé des coraux ,notamment en fournissant des nutriments essentiels et en protégeant contre les agents pathogènes. De même, les estuaires, zones de transition entre eaux douces et marines, présentent une forte variabilité physico-chimique et des apports nutritifs importants qui stimulent la diversité et l'activité microbienne .(te Velthuis et Fodor, 2016).**La Figure 1** ci-dessous illustre la richesse microbienne des récifs coralliens .

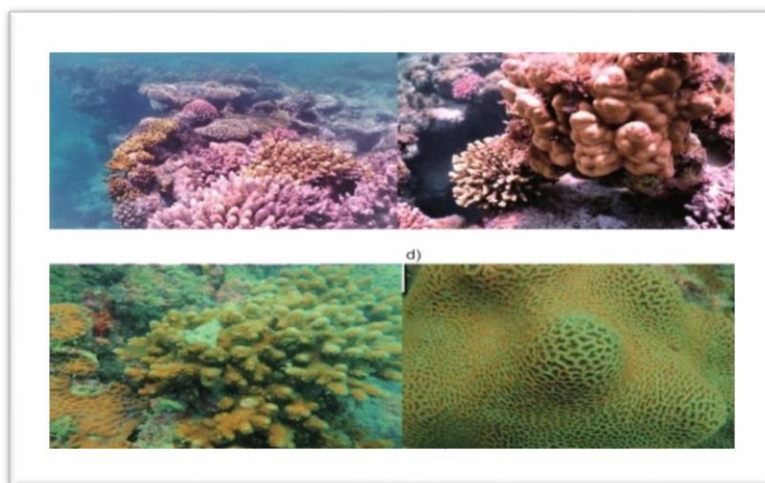


Figure 1 :Diversité des coraux dans un récif, habitat propice aux communautés microbiennes symbiotiques (Bourne, 2016)

1.3.2 Sédiments marins et biofilms benthiques

Les sédiments marins constituent un habitat riche en micro-organismes, notamment dans les biofilms benthiques .Comme le montre **la Figure 2**,ces biofilms présentent une structure

tridimensionnelle complexe qui reflète l'organisation des communautés microbiennes. Ces communautés structurées participent activement à la dégradation de la matière organique et aux cycles biogéochimiques, influençant la qualité des écosystèmes marins profonds (Lüthi et al., 2008).

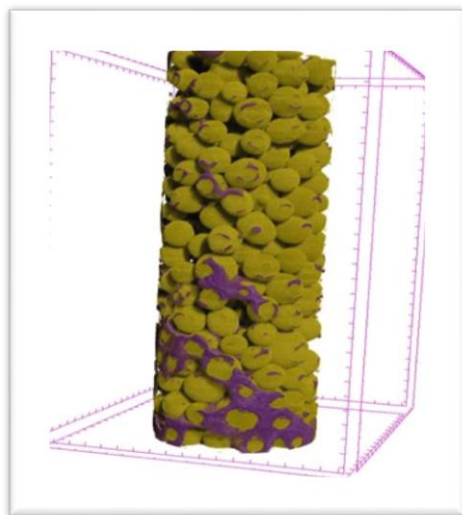


Figure 2 : Image en tomographie 3D d'un biofilm microbien (en violet) isolé de sédiments marins, illustrant la structure complexe des communautés microbiennes benthiques (Guilherme Silva et al., 2017)

1.3.3 Zones de remontée d'eau froide et sources hydrothermales

Les zones de remontée d'eau froide (upwellings) apportent des nutriments essentiels en surface, favorisant une forte productivité biologique et une diversité microbienne importante. Par ailleurs, les sources hydrothermales profondes abritent des micro-organismes extrémophiles adaptés à des conditions physico-chimiques extrêmes, jouant un rôle clé dans les cycles élémentaires et représentant une source d'enzymes à fort potentiel biotechnologique

1.4 Environnements marins extrêmes et intérêt biotechnologique

Les environnements marins extrêmes, tels que les sources hydrothermales profondes et les zones polaires, se caractérisent par des conditions physico-chimiques sévères, notamment des températures très élevées ou très basses, des pressions intenses, ainsi qu'une forte concentration en métaux et sulfures toxiques (Rothschild et Mancinelli, 2001). **La Figure 3** présente une vue des sources hydrothermales typique de milieu extrême sous-marin. Ces milieux abritent des micro-organismes extrémophiles capables de survivre grâce à des adaptations biochimiques spécifiques, telles que des enzymes thermo-stables, baro-résistantes ou psychroactives. **La Figure 4** met en évidence une communauté microbienne dense autour

d'une cheminée hydrothermale, illustrant la vie extremophile dans ces environnements hostiles. (Caviccholi et *al.*, 2019) .

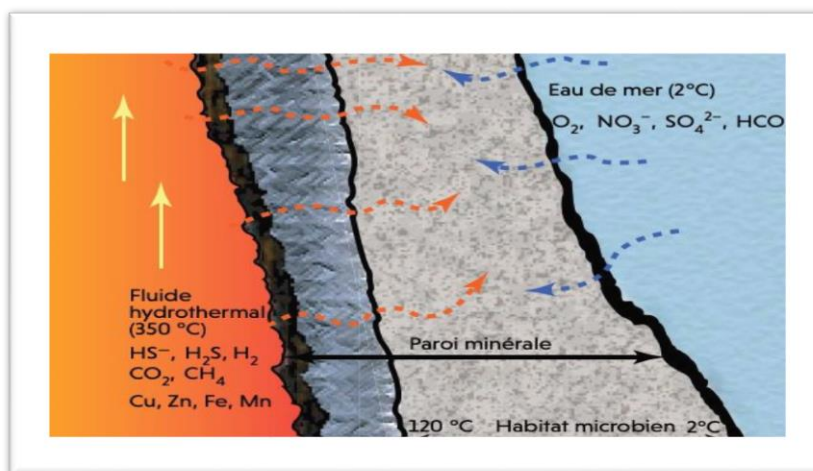


Figure 3 :Les source hydrothermales(Bris, 2019)



Figure 4 :Communauté microbienne dense autour d'une cheminée hydrothermale profonde, illustrant la vie extrêmophile adaptée à des conditions physico-chimiques extrêmes .(Bris, 2019)

Les enzymes extrêmes produites par ces micro-organismes, appelées extrêmolyses, présentent une grande stabilité et efficacité dans des conditions où les enzymes classiques sont inactives. Elles sont utilisées dans diverses applications biotechnologiques, notamment dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires, chimiques et environnementales, permettant d'optimiser les procédés industriels soumis à des conditions sévères .

1.4.1 Définition des milieux extrêmes marins (fumeurs hydrothermaux, zones polaires)

Les milieux extrêmes marins sont des habitats caractérisés par des conditions physico-chimiques extrêmes, telles que des températures très élevées, des pressions intenses, une absence de lumière, ou des concentrations élevées en métaux et composés toxiques. Les

fumeurs hydrothermaux, situés sur les dorsales océaniques, présentent des températures pouvant dépasser 400 °C sous une pression élevée, ainsi qu'une forte concentration en sulfures métallique (Dick, 2019). À l'inverse, les zones polaires sont caractérisées par des températures proches de 0 °C, une forte salinité et une lumière limitée, créant un environnement froid et oligotrophe (Caviccholi et *al.*, 2019).

1.4.2 Bactéries extrêmophiles et leurs propriétés adaptatives

Les bactéries extrêmophiles sont des micro-organismes capables de survivre et de se développer dans ces conditions extrêmes grâce à des adaptations biochimiques et physiologiques spécifiques. Elles possèdent des enzymes thermostables ou cryostables, des membranes cellulaires modifiées et des mécanismes de réparation de l'ADN efficaces, leur permettant de résister à la chaleur, au froid, à la pression ou à la toxicité des milieux (Rampelotto, 2013). Ces adaptations sont cruciales pour leur survie et leur fonctionnement métabolique dans des environnements où la plupart des formes de vie ne peuvent pas prospérer.

1.4.3 Applications biotechnologiques des enzymes extrêmes

Les extrêmozymes sont exploités pour leur robustesse opérationnelle dans des procédés industriels exigeants :

1.Bioremédiation : Dégradation de polluants en milieux hypersalins via des haloprotéases actives à haute salinité.

2.Industrie alimentaire :

- Amylases thermostables pour l'hydrolyse de l'amidon à haute température.
- Protéases alcaliphiles dans les détergents.

3.PCR : ADN polymérase hyperthermostable (ex. *Thermus aquaticus*) pour l'amplification génique.

4.Bioénergie : Production de biocarburants via des cellulases fonctionnant en conditions extrêmes.

Ces enzymes réduisent les coûts énergétiques et permettent des réactions écoresponsables sans solvants toxiques (Guézennec, J et Quéréllou, J, 2023)

Chapitre 02 :Les Bactéries Marines

2.Les Bactéries marines

2.1 Définition et caractéristiques morphologiques et physiologiques

Les bactéries marines sont des micro-organismes unicellulaires qui colonisent les milieux marins et jouent un rôle essentiel dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du soufre. Elles se distinguent par des caractéristiques morphologiques et physiologiques spécifiques qui leur permettent de s'adapter à des conditions extrêmes telles que la salinité élevée, la pression intense et les variations thermiques (Martens et Nealson, 2007).

2.1.1 Morphologie des bactéries marines

Les bactéries marines présentent une diversité morphologique importante, adoptant des formes variées comme les cocci (sphériques), les bacilles (en bâtonnets) et les spirilles (en spirale). **La Figure 5** illustre cette variété de formes bactérienne observées en milieu marin. Ces morphologies sont souvent influencées par les conditions environnementales. Certaines espèces forment des biofilms, des agrégats cellulaires adhérant aux surfaces telles que les roches ou les sédiments, ce qui leur confère une protection face aux stress environnementaux. La coloration de Gram, positive ou négative, constitue un critère de classification, avec des groupes dominants comme les Proteobacteria, Firmicutes et Cyanobacteria (Licciano et *al.*, 2007a).



Figure 5: Les différentes formes de bacteries.

2.1.2 Adaptations physiologiques

Les bactéries marines ont développé diverses adaptations physiologiques pour survivre dans des environnements variés :

•**Salinité** : Généralement halophiles, elles maintiennent un équilibre osmotique interne grâce à des pompes ioniques régulant le transport des ions et de l'eau à travers leur membrane cellulaire (Dalmaso et *al.*, 2015a).

•**Température** : Elles se répartissent entre psychrophiles, optimisées pour les basses températures, et thermophiles, adaptées aux environnements chauds comme les sources hydrothermales.

•**Pression** : Les bactéries des profondeurs abyssales tolèrent des pressions très élevées grâce à des membranes cellulaires et enzymes spécifiques.

•**Enzymes spécialisées** : Elles produisent des enzymes actives dans des conditions extrêmes, telles que des lipases, protéases et amylases, qui présentent un intérêt biotechnologique pour la bioremédiation et la production de biocarburants.

2.1.3 Mécanismes de résistance et de survie

Au-delà des adaptations physiologiques, les bactéries marines disposent de mécanismes spécifiques pour résister aux conditions défavorables :

•Elles contrôlent le transport ionique via des canaux membranaires pour gérer les fluctuations de salinité (Martens et Nealson, 2007).

•Elles sécrètent des enzymes capables de décomposer des composés toxiques et de réparer les dommages de l'ADN causés par le stress environnemental. Certaines espèces peuvent former des spores ou des formes dormantes, assurant leur survie lors de conditions extrêmes (Licciano et *al.*, 2007a).

2.2 Classification des bactéries marines

Les bactéries marines constituent un groupe diversifié de micro-organismes adaptés à la vie dans les environnements océaniques. Leur classification repose sur plusieurs critères, notamment morphologiques, physiologiques, biochimiques et génétiques. Parmi les critères les plus utilisés figure leur capacité à s'adapter aux conditions spécifiques de salinité, de température et de pression propres aux milieux marins. Cette classification permet de mieux comprendre leur rôle écologique et leurs potentialités biotechnologiques (Yakimov et *al.*, 2007).

2.2.1 Bactéries halophiles

Les bactéries halophiles sont des microorganismes capables de croître dans des milieux à haute salinité, tels que les eaux marines. Elles se divisent en plusieurs sous-catégories selon la concentration en sel supportée par chaque groupe. Les halophiles modérés prospèrent dans des environnements contenant entre 3 et 15 % de sel, tandis que les halophiles extrêmes sont

adaptées à des concentrations de sel de 15 à 30 %. Les ultra-halophiles sont capables de survivre dans des milieux où la salinité dépasse les 30 % (Oren, 2002) .

2.2.2 Psychrophiles et psychrotrophes marines

Les psychrophiles sont des bactéries adaptées aux basses températures, généralement inférieures à 15°C, et se rencontrent dans des habitats froids tels que les eaux polaires ou les profondeurs océaniques. Elles possèdent des enzymes et des protéines thermolabiles, capables de fonctionner efficacement à ces températures basses, grâce notamment à une membrane riche en lipides polyinsaturés qui maintient la fluidité membranaire. Par contraste, les psychrotrophes peuvent croître sur une plage de températures plus large, mais préfèrent également les températures froides. Leur capacité à s'adapter à des conditions thermiques variables leur confère une plus grande flexibilité écologique. Ces bactéries jouent un rôle important dans les cycles biogéochimiques des zones froides marines (Yakimov et *al.*, 2007).

2.2.3 Thermophiles marines

Les thermophiles marines prospèrent dans des environnements chauds, souvent au-dessus de 45°C, tels que les sources hydrothermales sous-marines. Elles produisent des enzymes thermostables qui conservent leur activité biologique à haute température, ce qui leur permet de dégrader efficacement la matière organique dans ces conditions extrêmes. Ces bactéries sont également d'un grand intérêt biotechnologique pour la production d'enzymes résistantes à la chaleur, utilisées dans diverses industries ((Dalmaso et *al.*, 2015b).

2.3 Adaptations des bactéries marines aux environnements extrêmes

Les bactéries marines, confrontées à des conditions environnementales rigoureuses (températures variables, pressions hydrostatiques élevées, salinité fluctuante et nutriments limités), ont développé des mécanismes d'adaptation sophistiqués pour assurer leur survie et reproduction. Ces adaptations impliquent des modifications des membranes cellulaires, des protéines et des enzymes.

2.3.1 Adaptation membranaire

Les membranes cellulaires bactériennes ajustent leur composition lipidique pour maintenir fluidité et intégrité face aux contraintes environnementales :

•**Température** : Les psychrophiles (adaptées au froid) incorporent des acides gras insaturés pour maintenir la fluidité membranaire à basse température, tandis que les

thermophiles (adaptées à la chaleur) privilégient les lipides saturés pour éviter une fluidité excessive à des températures élevée (Minic *et al.*, 2006) .

•**Salinité** : Les halophiles (tolérantes au sel) modifient la structure membranaire pour résister à la déstabilisation induite par le sel, augmentant généralement la proportion de lipides polyinsaturés et ajustant les protéines membranaires (Saker, 2018) .

Ces adaptations membranaires régulent les flux ioniques et préviennent la perte ou l'entrée excessive de composés chimiques, assurant l'homéostasie cellulaire.

2.3.2 Adaptation des protéines

Les bactéries marines stabilisent et maintiennent la fonction protéique dans des conditions extrêmes grâce à divers mécanismes, notamment les protéines chaperonnes, qui aident au repliement correct des protéines sous stress thermique.

•**Protéines thermophiles** : Ces protéines résistantes à la chaleur présentent une structure compacte, enrichie en ponts disulfures, ce qui les rend moins sensibles à la dénaturation thermique.(Vieille et Zeikus, 2001).

•**Protéines psychrophiles** : Ces protéines flexibles à basse température ont des structures moins rigides, avec des segments polypeptidiques plus courts, facilitant les réactions enzymatiques à des températures froides (Coquelle, 2008).

L'adaptation des protéines est essentielle pour la survie et l'activité enzymatique sous stress.

2.3.3 Adaptation enzymatique

Les enzymes bactériennes marines sont adaptées aux conditions environnementales extrêmes (température, salinité, pH).

•**Thermostabilité** : Les enzymes thermophiles, comme la Taq polymérase, sont résistantes aux températures élevées grâce à des modifications de leur structure tertiaire et quaternaire, augmentant leur stabilité et leur proportion de résidus hydrophobes (Lawyer *et al.*, 1993).

•**Halotolérance** : Les enzymes halophiles conservent leur activité catalytique en milieu salin, souvent caractérisées par une activité stable à des concentrations élevées de NaCl (Maturrano *et al.*, 2006).

Ces adaptations enzymatiques ouvrent des applications industrielles en biotechnologie et pharmacologie, où des conditions extrêmes sont courantes.

2.3.4 Adaptation au stress oxydatif

Le stress oxydatif, dû à la présence d'oxygène dissous et à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), est un défi majeur. Les bactéries marines développent des systèmes antioxydants efficaces :

- **Enzymes antioxydantes** : La superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la peroxydase neutralisent les effets néfastes des ERO, réduisant les dommages cellulaires (Poli *et al.*, 2017) .

- **Mécanismes moléculaires** : Des facteurs de transcription spécifiques (OxyR et SoxR) induisent la production d'enzymes antioxydantes en réponse au stress oxydatif (Verneuil *et al.*, 2004) .

2.3.5 Adaptation à la pression hydrostatique

Dans les environnements marins profonds, la pression hydrostatique peut altérer la structure et la fonction des macromolécules. Les bactéries barophiles s'adaptent :

- **Modification des protéines** : Les protéines barophiles sont spécialement conçues pour rester fonctionnelles sous haute pression, avec une structure plus souple et moins compactée (Amrani, 2015).

- **Adaptation des membranes** : L'augmentation de la quantité de lipides polyinsaturés améliore la fluidité des membranes sous des pressions extrêmes (略, 2012). (Oger and Cario, 2014).

Ces adaptations sont essentielles pour la survie dans les profondeurs marines.

2.4 Intérêts écologiques et biotechnologiques des bactéries marines

Les bactéries marines sont non seulement essentielles pour la santé des écosystèmes marins, mais elles ont aussi un large éventail d'applications biotechnologiques et industrielles.

Comme indiqué dans **le tableau 1**.

Tableau 1 : : Intérêts écologiques et biotechnologiques des bactéries marines.

Catégorie	Intérêt Principal	Explication	Référence
Écologique	Recyclage nutriments	Décomposition matière organiques cycles C/N	(Vos et al., 2007a).
	Biodiversité	Equilibre écosystèmes	(Licciano et al., 2007b)
	Dépollution naturelle	Dégradation des polluants	(Romanenko et al., 13).
	Résilience écosystèmes	Adaptation aux perturbation	(Romanenko et al., 13).
Biotechnologie	Bioremédiation	Nettoyage sites contaminés	(Romanenko et al., 13).
	Enzymes extrêmes	Application industrielles	(Licciano et al., 2007c).
	Application industrielles	Pharma, agroalimentaire, environnement	(Licciano et al., 2007c).
	Biomatériaux	Produits durables	(Vos et al., 2007b).

Chapitre 03 :Les Enzymes Microbiennes

3. Les enzymes microbiennes

3.1 Définition d'une enzyme

3.1.1 Généralité

Les enzymes sont des biocatalyseurs naturels, principalement des protéines, qui accélèrent les réactions biochimiques sans être consommées lors du processus. Elles facilitent la transformation des substrats en produits en diminuant l'énergie d'activation nécessaire, ce qui permet à des réactions métaboliques vitales de se dérouler à une vitesse compatible avec la vie (Nelson et Cox., 2017). Leur spécificité et leur efficacité dépassent largement celles des catalyseurs chimiques classiques, ce qui en fait des éléments indispensables en biotechnologie.

3.1.2 Mécanisme d'action enzymatique

Le mécanisme classique par lequel une enzyme agit repose sur l'interaction entre celle-ci et son substrat au niveau d'un site actif spécifique. Ce site possède une complémentarité stérique et chimique avec le substrat, conformément au modèle de l'ajustement induit (induced fit model) proposé par Koshland en 1958. Ce modèle dynamique d'interaction est bien représenté visuellement, comme on peut l'observer sur la **Figure 6**. Lorsque le complexe enzyme-substrat est formé, l'enzyme facilite la conversion du substrat en produit(s), puis elle est libérée intacte, prête à catalyser un nouveau cycle (Berg, J.M et al., 2019).

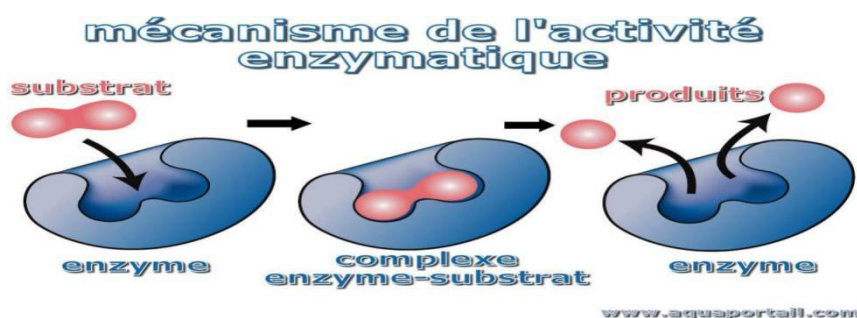


Figure 6 :Les mécanisme de l'action enzymatique .

3.1.3 Caractéristiques des enzymes

Les enzymes possèdent plusieurs propriétés distinctives :

- Une spécificité très élevée pour leurs substrats,
- Une activité catalytique importante, quantifiée par le nombre de cycles catalytiques par seconde (kcat),

- Une régulation précise grâce à des effecteurs, qu'ils soient activateurs ou inhibiteurs,
- Des conditions optimales de température et de pH, qui varient en fonction de leur origine biologique (Bisswanger, H, 2014) .

3.1.4 Classification enzymatique

Selon la nomenclature internationale établie par l'IUBMB, les enzymes sont classées en six grandes classes principales, comme présenté dans la **Figure 7**:

- **Oxydoréductases** : catalysent les réactions d'oxydoréduction,
- **Transférases** : transfèrent des groupes fonctionnels d'une molécule à une autre,
- **Hydrolases** : clivent des liaisons covalentes par hydrolyse (par exemple, protéases, lipases),
- **Lyases** : éliminent des groupes sans hydrolyse ni oxydation, souvent en formant des doubles liaisons,
- **Isomérases** : catalysent des réarrangements intramoléculaires,
- **Ligases** : forment des liaisons covalentes en consommant de l'ATP (‘IUBMB Nomenclature Home Page,’ 2021).

Enzyme Classification	
CLASS 1. OXIDOREDUCTASES Enzymes which catalyse redox reactions involving transfer of electrons/hydrogen atom/ oxygen atom. eg. Peroxidases, catalases, oxygenases reductases $A^{+2} + B^{+3} \rightarrow A^{+3} + B^{+2}$	CLASS 2. TRANSFERASES Enzymes which catalyse transfer of an atom or a functional group between two molecules. eg. Acyl transferases, kinases, transaldolases $A-X + B \rightarrow A + B-X$
CLASS 3. HYDROLASES Enzymes which catalyse hydrolytic reactions and their reversal. eg. Lipases, amylases, proteases, nucleases $AB + H_2O \rightarrow AOH + BH$	CLASS 4. LYASES/ SYNTHASES Enzymes involved in elimination reactions in the absence of water, leading to formation of double bonds or addition across a double bond. eg. Aldolase, decarboxylase $A-X + B-Y \rightarrow A=B + XY$
CLASS 5. ISOMERASES Enzymes which catalyse isomerisation and racemization reactions. eg. Epimerase, isomerase, intramolecular transferase $A-X + B-Y \rightarrow \begin{matrix} A-B \\ Y \quad X \end{matrix}$	CLASS 6. LIGASES/ SYNTHETASES Enzymes which catalyse synthesis of a C-X bond while utilizing ATP. eg. Peptide synthetase, amino-acid RNA ligase $A + B + ATP \rightarrow AB + ADP + P_i$

Figure 7 : Classification des enzyme .

3.1.5 Spécificité des enzymes microbiennes marines

Les bactéries marines, qui vivent souvent dans des environnements extrêmes caractérisés par une forte salinité, des températures variables et une pression élevée, produisent des enzymes dotées d'une stabilité renforcée et capables de tolérer ces conditions difficiles. Ces enzymes

sont qualifiées d'halotolérantes, psychrotolérantes, barotolérantes ou thermostables, ce qui leur confère un intérêt croissant pour des applications industrielles, médicales et environnementales (Rao, M. B et *al.*, 2013). Leur adaptation aux contraintes physico-chimiques de leur milieu naturel fait d'elles des biocatalyseurs précieux pour des procédés nécessitant une robustesse extrême.

3.2 Catégories enzymatiques produites par les bactéries marines

Les bactéries marines constituent une source enzymatique d'intérêt majeur, produisant des biocatalyseurs aux propriétés physico-chimiques optimisées pour les conditions extrêmes du milieu océanique (haute pression, salinité élevée, températures variables). Ces enzymes se caractérisent par une activité catalytique spécifique, une stabilité accrue et une robustesse fonctionnelle, ce qui en fait des candidats privilégiés pour des applications biotechnologiques et industrielles avancées.

3.2.1 Amylases

Les amylases, enzymes hydrolases, catalysent l'hydrolyse des liaisons α -1,4 glycosidiques dans l'amidon et autres polysaccharides complexes, générant des oligosaccharides et des monosaccharides tels que le maltose et le glucose. Les amylases d'origine marine se distinguent par leur halotolérance et leur thermostabilité, adaptées aux procédés industriels soumis à des contraintes salines et thermiques.

Par exemple, des souches de *Bacillus* isolées de sédiments marins synthétisent des amylases halotolérantes avec une activité optimale à haute température, exploitables dans les secteurs textile et agroalimentaire (Enez, 2020).

3.2.2 Protéases

Les protéases hydrolysent les liaisons peptidiques des protéines, constituant un groupe enzymatique industriel clé. Les protéases marines, notamment issues des genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alteromonas* et *Vibrio*, exhibent une activité catalytique optimale en milieu alcalin et une résistance significative à la salinité élevée (Zhou et *al.*, 2009).

Leur utilisation s'étend aux formulations détergentes, aux traitements dermatologiques enzymatiques, à la gestion des effluents protéiques, ainsi qu'à la biotransformation de biomasse marine.

3.2.3 Lipases

Les lipases catalysent l'hydrolyse des triglycérides en glycérol et acides gras libres. Les lipases marines présentent une activité fonctionnelle dans des environnements hydrophobes, à basse température (psychrophilie) et en présence de solvants organiques, propriétés rares chez les enzymes terrestres.

Ces biocatalyseurs sont largement exploités dans les industries agroalimentaire, pharmaceutique (synthèse chimiosélective), cosmétique, et dans les processus de bioremédiation des hydrocarbures (Joseph et *al.*, 2008).

3.2.4 Cellulases

Les cellulases catalysent la dégradation enzymatique de la cellulose, polymère glucidique majoritaire dans la biomasse végétale. Les cellulases marines, souvent dérivées de bactéries symbiotiques associées à des mollusques ou crustacés, présentent une activité optimale à basse température et une tolérance élevée aux sels, ce qui les rend pertinentes pour les industries papetière, textile et la valorisation des résidus lignocellulosiques (Sauka et *al.*, 2010).

3.2.5 Chitinases

Les chitinases hydrolysent la chitine, polysaccharide structural majeur des exosquelettes crustacés et des parois fongiques. Les chitinases marines, produites par des genres tels que *Vibrio* et *Aeromonas*, fonctionnent efficacement à basse température et en milieu salin.

Elles sont exploitées dans la lutte biologique contre les phytopathogènes fongiques, dans la transformation des déchets de fruits de mer, et pour la production de chitooligosaccharides à visée biomédicale (Yang et *al.*, 2006).

3.2.6 Esterases, DNases et autres hydrolases

Les esterases marines hydrolysent les liaisons ester dans divers substrats organiques, avec une tolérance élevée aux solvants organiques. Les DNases dégradent l'ADN extracellulaire, jouant un rôle crucial dans les stratégies anti-biofilm et dans l'extraction d'acides nucléiques en biotechnologie marine.

Par ailleurs, des enzymes telles que les alginate lyases, laminarinases et sulfatases sont également produites par les bactéries marines, intervenant dans la dégradation spécifique des polysaccharides algaux.

3.3 Facteurs influençant la production enzymatique

La biosynthèse enzymatique chez les bactéries marines est soumise à une régulation complexe, dépendant de multiples paramètres environnementaux et physiologiques. La maîtrise de ces facteurs est cruciale pour maximiser la production enzymatique en vue d'applications industrielles et biotechnologiques. Les éléments essentiels de cette régulation sont listés dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : : Facteurs influençant la production enzymatique.

Facteur	Effet sur la production enzymatique	Exemple / Référence
Température	Influence la croissance bactérienne et l'expression des gènes enzymatiques ; favorise des enzymes psychrophiles ou thermostables	α -amylase de <i>Bacillus sp.</i> marine active à 70 °C (Demirkan, 2011)
Ph	Modifie l'activité catalytique et la stabilité des enzymes ; les enzymes marines tolèrent de larges plages de pH.	Tolérance au pH acide, neutre ou basique (Trincone, 2011).
Salinité	Affecte la structure et la fonction enzymatique ; essentielle pour les bactéries halophiles.	Lipases de <i>Halomonas sp.</i> actives jusqu'à 20 % de NaCl (Joseph, B et <i>al.</i> , 2008)
Source de carbone	Stimule la production d'enzymes selon la nature du substrat disponible (glucose, amidon, cellulose, etc.).	Induction d'amylases, cellulases ou protéases (Dutta et Ray, 2009).

3.4 Caractéristiques des enzymes marines

Les enzymes produites par les bactéries marines possèdent des propriétés uniques, résultat de leur adaptation aux conditions souvent extrêmes de leur environnement océanique. Ces particularités les rendent particulièrement intéressantes pour diverses applications dans les secteurs industriel, environnemental et pharmaceutique. Parmi les qualités les plus recherchées chez ces enzymes figurent leur thermostabilité, leur tolérance au sel (halotolérance), leur résistance à la pression (barotolérance), leur activité à basse température, ainsi que leur capacité à fonctionner en présence de solvants organiques.

3.4.1 Thermostabilité

Certaines enzymes marines, notamment celles provenant de bactéries thermophiles isolées dans des sources hydrothermales profondes, démontrent une stabilité exceptionnelle à des températures élevées. Elles conservent leur structure tridimensionnelle et leur activité catalytique au-delà de 70 °C, un atout majeur pour les industries textile, agroalimentaire et papetière, où les procédés se déroulent souvent à haute température (Zhang et Kim, 2010b) par exemple, des protéases thermostables issues de *Thermococcus spp.* peuvent maintenir leur activité pendant plusieurs heures à 90 °C.

3.4.2 Halotolérance

La forte salinité des milieux marins nécessite des enzymes capables de fonctionner efficacement en présence de concentrations élevées en sels. Les enzymes halotolérantes, produites par des bactéries halophiles telles que celles des genres *Halomonas* ou *Salinivibrio*, restent actives dans des environnements contenant jusqu'à 20 % de NaCl (Henner Brinkmann et al., 2020). Cette caractéristique est particulièrement avantageuse pour des procédés industriels à haute osmolarité, comme la production de bioéthanol ou le traitement des eaux usées salines.

3.4.3 Psychrotolérance (activité à basse température)

Les enzymes psychrophiles ou psychrotolérantes, issues de bactéries vivant dans les régions polaires ou les profondeurs abyssales, présentent une activité optimale entre 4 et 20 °C et peuvent fonctionner même à 0 °C. Leur structure plus flexible leur permet de catalyser efficacement à basse température, contribuant ainsi à des économies d'énergie dans les applications industrielles (Debashish et al., 2005), elles sont notamment utilisées dans les lessives enzymatiques pour le lavage à froid.

3.4.4 Barotolérance

Les enzymes barotolérantes sont adaptées à la haute pression hydrostatique des grandes profondeurs marines, pouvant atteindre jusqu'à 1 100 bars. Cette adaptation structurale leur permet de conserver leur activité catalytique dans ces conditions extrêmes. Bien que leur exploitation reste limitée, elles offrent un potentiel important pour des bioprocédés sous pression ou l'extraction de biomolécules en milieu pressurisé (ong-Jian Ding et *al.*, 2021).

3.4.5 Tolérance aux solvants organiques

Certaines enzymes marines, en particulier les lipases et estérases, maintiennent leur activité dans des milieux contenant des solvants organiques tels que le toluène, l'éthanol ou l'acétone. Cette propriété est cruciale pour les réactions de synthèse organique en milieu non aqueux, notamment dans la fabrication de composés pharmaceutiques et de bioplastiques (Trincone, 2011).

3.5 Applications biotechnologiques et industrielles des enzymes marines

Les enzymes d'origine marine attirent de plus en plus l'attention dans le domaine de la biotechnologie, notamment grâce à leurs propriétés exceptionnelles telles que leur stabilité dans des conditions extrêmes, leur haute spécificité catalytique et leur capacité à fonctionner dans des environnements inhabituels. Ces caractéristiques ouvrent de nombreuses perspectives d'utilisation dans des secteurs variés, allant de la santé à l'agroalimentaire, en passant par la protection de l'environnement et l'industrie chimique.

3.5.1 Industrie pharmaceutique

Dans le secteur pharmaceutique, les enzymes marines jouent un rôle crucial dans la fabrication de composés bioactifs, notamment des antibiotiques et des agents anticancéreux. Par exemple, certaines chitinases extraites d'organismes marins facilitent la production de chitooligosaccharides reconnus pour leurs effets immunostimulants et anticancéreux. Par ailleurs, les lipases marines sont employées pour la synthèse stéréospécifique de précurseurs pharmaceutiques, offrant ainsi une alternative plus écologique aux méthodes chimiques classiques (Trincone.,2011) .

3.5.2 Industrie agroalimentaire

Les enzymes marines telles que les amylases, protéases et lipases sont largement utilisées pour optimiser la texture, le goût, la conservation et la digestibilité des produits alimentaires. Les amylases marines interviennent notamment dans la conversion de l'amidon en sirop de glucose, tandis que les protéases facilitent l'attendrissement des viandes ou la clarification des

jus de fruits. Leur résistance aux variations de température et à la salinité en fait des outils particulièrement adaptés aux procédés agroalimentaires (Vijayalakshmi et *al.*, 2020).

3.5.3 Environnement et bioremédiation

Les enzymes provenant de bactéries marines sont exploitées pour la dégradation des polluants organiques et des hydrocarbures dans les milieux marins et côtiers. Par exemple, les lipases contribuent à la biodégradation des huiles, tandis que certaines oxydoréductases, comme les laccases, permettent l'oxydation de composés aromatiques toxiques. Ces enzymes sont également utilisées dans le traitement des eaux usées et la décomposition des plastiques biodégradables (Joseph et *al.*, 2008).

3.5.4 Industrie textile et papetière

Dans les industries textile et papetière, les cellulases et xylanases marines sont intégrées pour améliorer le traitement des fibres végétales, adoucir les tissus, optimiser la qualité du papier recyclé et faciliter le blanchiment de la pâte. Leur tolérance aux solvants, aux températures élevées ainsi qu'aux milieux acides ou alcalins représente un avantage significatif par rapport aux enzymes conventionnelles.

3.5.5 Bioénergie et valorisation des déchets

Les enzymes marines jouent un rôle important dans la production de biocarburants, notamment par la dégradation des biomasses lignocellulosiques. Des cellulases, hémicellulases et lipases hydrolysent les matières organiques en sucres fermentescibles, qui sont ensuite transformés en éthanol ou biodiesel. Elles permettent également la valorisation des déchets agro-industriels issus des produits de la mer, contribuant ainsi à une économie circulaire (Dutta et Ray, 2009).

3.5.6 Cosmétique et soins dermatologiques

Enfin, dans le domaine cosmétique, des enzymes telles que les protéases et lipases sont incorporées dans des formulations pour leurs propriétés exfoliantes, hydratantes ou purifiantes. Par exemple, certaines protéases marines sont utilisées dans des peelings enzymatiques doux, adaptés aux peaux sensibles, grâce à leur stabilité dans des conditions de pH neutre ou légèrement acide.

Deuxième partie :
PARTIE
EXPERIMENTALE

1. Description du site d'échantillonnage

1.1 Localisation géographique

L'échantillonnage a été réalisé au niveau de la plage de Sidi Abdelaziz, située dans la commune de Sidi Abdelaziz (wilaya de Jijel), sur la côte nord-est de l'Algérie. Cette plage fait partie du littoral méditerranéen et se caractérise par un environnement marin naturel, non pollué et riche en biodiversité. Le site est situé à environ 30 km à l'est de la ville de Jijel.

Ce site a été sélectionné en raison de ses caractéristiques écologiques particulières, notamment la présence de zones sableuses et de sédiments riches en matière organique, favorables au développement de microorganismes marins (**Figure 8**).

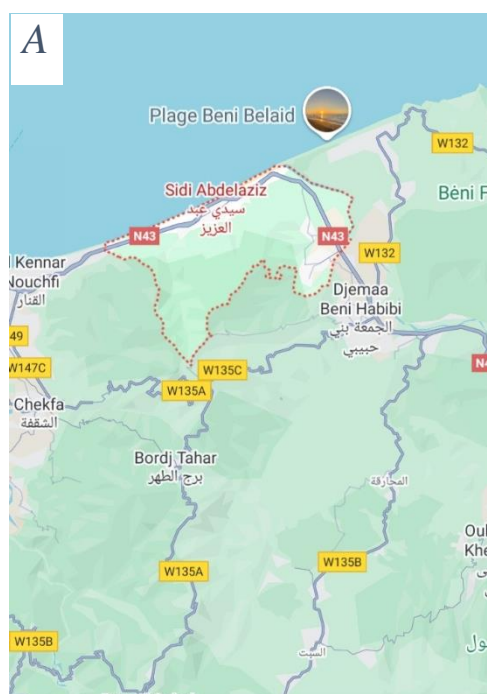


Figure 8 : Zone de prélèvement

1.2 Conditions physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques de l'eau de mer ont été mesurés in situ au moment du prélèvement, à l'aide des instruments appropriés. Les valeurs obtenues étaient les suivantes :

Température de l'eau : environ 20,5 °C, typique des eaux côtières méditerranéennes

pH : 8,2, mesuré à l'aide d'un pH-mètre portable

Conductivité électrique : environ 52 mS/cm.

2. Échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé le 09 mars 2025 au niveau de la plage de sidi abdelaziz (wilaya de Jijel), un site côtier représentatif de l'environnement marin de la région Est algérienne.

Les échantillons d'eau de mer ont été prélevés manuellement à l'aide de flacons stériles, plongés à environ 15 cm de profondeur afin de recueillir un volume représentatif et minimiser les contaminations superficielles (**Figure 9 ,A**) .

L'ensemble des manipulations a été réalisé avec le port de gants stériles à usage unique afin de prévenir toute contamination externe.

Des mesures in situ ont été effectuées au moment du prélèvement. La température de l'eau et le pH ont été mesurés respectivement à l'aide d'un thermomètre et d'un pH-mètre portable de type HANNA (HI8424), ce qui a permis d'avoir une première estimation des conditions physico-chimiques du site.(**Figure 9 ,B**).

Après prélèvement, les échantillons ont été immédiatement placés dans une glacière isotherme contenant des packs de glace, maintenant la température autour de 4 °C. Le transport vers le laboratoire a été effectué dans un délai n'excédant pas six heures, condition essentielle pour garantir la viabilité microbiologique des échantillons en vue de leur traitement ultérieur.



Figure 9 : : A) Photographie de l'échantillon prélevé B)Appareil de mesure du pH (Ph-mètre)

3.Isolement, purification et conservation des souches

3.1 Préparation des échantillons

Les échantillons d'eau de mer ont été collectés sur le site de la plage de Béni Bélaïd (Jijel) et transportés dans des flacons stériles, à une température de 4°C pour préserver la viabilité des micro-organismes. Une fois au laboratoire, une série de dilutions décimales a été réalisée dans

de l'eau de mer stérile, afin de réduire la densité bactérienne et de faciliter l'isolement de colonies distinctes sur les milieux de culture.

Les dilutions successives ont été utilisées pour l'ensemencement des milieux, permettant ainsi une meilleure séparation des colonies et l'isolation de souches bactériennes uniques.

3.2 Ensemencement sur milieux non sélectifs

L'isolement a été effectué par étalement en surface (spread plate), où 0,1 mL de chaque dilution a été inoculé sur trois milieux solides non sélectifs montré dans la **Figure 10**:

- Le milieu GN (Glucose Nutrient) : Un milieu nutritif standard, adapté à la croissance de bactéries hétérotrophes.
- Le milieu TSA (Tryptic Soy Agar) : Milieu riche en peptides, utilisé pour la culture de bactéries aux besoins nutritionnels complexes.
- Le milieu naturel marin : Préparé à base d'eau de mer prélevée sur le site, enrichie avec 10 g/L d'extrait de levure, 7,5 g/L d'extrait de viande et 20 g/L d'agar pour favoriser la croissance des bactéries marines adaptées aux conditions salines de l'environnement.

Les milieux ont été stérilisés à 121°C pendant 20 minutes avant l'ensemencement.

Les échantillons ont été introduits en conditions aseptiques sous une hotte à flux laminaire.



Figure 10 : Photos des milieux utilisés .

3.3 Incubation et conditions de culture

Les boîtes de Pétri ensemencées ont été incubées à deux températures spécifiques :

- 30°C et 37°C pour favoriser la croissance de bactéries mésophiles marines.

L'incubation a duré de 24 à 48 heures, selon la vitesse de croissance des colonies. Après cette période, les colonies morphologiquement distinctes ont été sélectionnées pour la purification.

3.4 Purification des isolats

Les colonies isolées, présentant des caractéristiques distinctes (telles que la forme, la taille, la couleur, etc.), ont été transférées directement sur des boîtes de Pétri contenant le même milieu de culture, à l'aide de la technique des stries d'épuisement. Cette technique a permis de garantir l'isolement et la conservation de la souche bactérienne, en répétant les transferts sur le même milieu pour obtenir des colonies monospécifiques. Cela a permis d'assurer que la souche soit préservée et maintenue le plus pur possible au cours du processus, sans contamination croisée. Chaque repiquage a été soigneusement effectué pour assurer une pureté optimale, nécessaire pour les analyses ultérieures de production enzymatique et d'identification bactérienne.

3.5 Méthodes de conservation

Après purification, les souches bactériennes ont été conservées afin de maintenir leur viabilité et leur stabilité génétique pour les analyses ultérieures.

les souches bactériennes purifiées ont été maintenues sur un milieu gélosé incliné, placé à une température de 4 °C. Cette méthode permet de préserver temporairement la viabilité et l'activité des souches, tout en évitant leur dessèchement. Des repiquages réguliers ont été effectués afin de maintenir la pureté des cultures et prévenir toute perte de vitalité bactérienne. Cette approche a été utilisée principalement pour les souches en cours d'analyse ou destinées à des manipulations à court terme.

4. Caractérisation morphologique et évaluation enzymatique

4.1 Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée dans le but de déterminer la structure de la paroi cellulaire des souches bactériennes isolées, ce qui constitue une étape fondamentale dans la classification bactériologique. Cette méthode permet de différencier les bactéries Gram positives, qui possèdent une épaisse couche de peptidoglycane, des Gram négatives, dont la paroi est plus mince et composée d'une membrane externe riche en Lipopolysaccharides.

Préparation du frottis :

Une goutte de la suspension bactérienne a été déposée au centre d'une lame porte-objet propre à l'aide d'une pipette Pasteur. Elle a ensuite été étalée délicatement sur la surface de la lame par des mouvements circulaires ou linéaires. Après un séchage complet à l'air libre, la lame a été fixée en la passant rapidement plusieurs fois dans la flamme d'un bec Bunsen, à l'aide d'une pince stérile. Cette fixation thermique permet d'adhérer les cellules bactériennes à la lame tout en préservant leur structure.

Étapes de coloration :

Coloration primaire : la lame a été recouverte de violet de gentiane pendant une minute, puis rincée à l'eau distillée.

Mordantage : la lame a été ensuite recouverte de lugol durant une minute, puis rincée à nouveau.

Décoloration : un rinçage à l'alcool a été effectué jusqu'à disparition de la coloration violette, suivi d'un rinçage immédiat à l'eau distillée.

Coloration secondaire : enfin, la lame a été recouverte de fuchsine pendant 30 secondes à une minute, rincée à l'eau, puis séchée avec un papier absorbant propre .

L'observation microscopique a été effectuée à l'aide de l'objectif à immersion ($\times 100$), après application d'une goutte d'huile d'immersion sur le frottis. Les bactéries à Gram positif se sont révélées colorées en violet, tandis que les bactéries à Gram négatif sont apparues en rose .

4.2 Détection des activités enzymatiques extracellulaires

La production d'enzymes extracellulaires par les bactéries est un critère important pour évaluer leur potentiel fonctionnel. Ces enzymes, comme les protéases, lipases et amylases, permettent la dégradation de différents substrats. Leur détection sur milieux spécifiques est une méthode rapide et efficace pour identifier les souches actives.

4.2.1 Activité protéolytique

L'activité protéolytique des souches bactériennes a été évaluée sur deux milieux modifiés : la gélose nutritive (GN) et le Tryptic Soy Agar (TSA), enrichis par l'ajout de lait écrémé stérile (0,2 mL pour 100 mL de milieu), constituant une source de caséine. Les milieux ont été préparés, stérilisés par autoclave, puis ensemencés par touche centrale.

Les boîtes ont été incubées à deux températures (30 °C et 37 °C) pendant une durée de 24 à 48 heures. L'activité enzymatique est révélée par la formation d'un halo clair autour des colonies, traduisant l'hydrolyse de la caséine par les protéases sécrétées (Harrigan et Mecance, 1976). Une activité est considérée comme significative lorsque la zone de lyse dépasse 3 mm de diamètre, mesurée quotidiennement selon les recommandations de Ronald et Harold (1970).

La gélose enrichie au lait est un milieu couramment utilisé en raison de sa simplicité, de sa richesse en protéines et de son faible coût (Smith et *al.*, 1952).

4.2.2 Activité amylolytique

L'activité amylolytique a été évaluée sur gélose nutritive (GN) et Tryptic Soy Agar (TSA) modifiés par l'ajout d'amidon soluble comme source glucidique. Après stérilisation de 100 mL de milieu, 2 g d'amidon soluble ont été incorporés une fois le milieu refroidi (De Vos et *al.*, 2009). Les souches bactériennes ont étéensemencées sur ces milieux puis incubées à 30 °C et 37 °C pendant 24 à 48 heures.

Après incubation, les boîtes ont été recouvertes d'une solution iodée de lugol pendant environ 30 secondes, suivie d'un rinçage à l'eau distillée. L'iode contenu dans la solution forme un complexe de couleur bleu-noir avec l'amidon non hydrolysé. La présence d'un halo clair autour des colonies traduit l'hydrolyse de l'amidon par les amylases extracellulaires produites par les souches testées (Tatsinkou et *al.*, 2005).

4.2.3 Activité lipolytique

L'activité lipolytique des souches bactériennes a été évaluée sur trois milieux : gélose nutritive (GN), Tryptic Soy Agar (TSA) et gélose marine naturelle (MN), tous modifiés par l'ajout de 2 mL de Tween 80 pour 100 mL de milieu. Les milieux ont été stérilisés, refroidis, puisensemencés avec les souches testées.

Les boîtes ont été incubées à deux températures (30 °C et 37 °C) pendant 24 à 48 heures. L'hydrolyse des lipides du Tween 80, due à la production de lipases extracellulaires, est révélée par l'apparition d'un halo translucide, parfois fluorescent, autour des colonies (sierra,1957). Ce test est simple, sensible et couramment utilisé pour détecter les activités lipasiques chez les microorganismes.

5. Identification biochimique (à l'aide de la galerie API20)

Principe

La galerie API 20E (Analytical Profile Index) est un système miniaturisé standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et des bacilles à Gram négatif non exigeants. Composée de 20 tests biochimiques et enzymatiques, elle permet une identification rapide (18-24 h) via l'interprétation d'un profil numérique. Bien que conçue pour des souches cliniques, des adaptations (ex. modification du diluant) améliorent sa fiabilité pour les bactéries marines halophiles.

Composition de la galerie

- 20 microtubes contenant des substrats déshydratés pour tests enzymatiques (ex. ONPG, TDA) et métaboliques (ex. fermentation du glucose, citrate).
- Réactifs spécifiques : Kovacs (indole), FeCl_3 (TDA), etc.
- Diluant adapté : Une suspension saline à 20 % de sels marins (au lieu de NaCl 0,85 %) est recommandée pour les souches marines, améliorant la réactivité des tests.

Protocole expérimental

1. Préparation de l'inoculum :

- Prélever des colonies pures et homogénéiser dans 10 ml d'eau physiologique stérile afin d'obtenir une suspension bactérienne dense dont la turbidité est ajustée à 0,5 McFarland.

2. Inoculation :

- Remplir les microtubes et cupules concernés (CIT, VP, GEL).
- Ajouter de l'huile minérale dans les tests nécessitant une anaérobiose (ADH, LDC, ODC, URE, H_2S).

3. Incubation :

- Placer les galeries dans une boîte humidifiée à 30 et 37°C pendant 18-24 h (adapté aux souches psychrophiles/mésophiles marines).

4. Lecture :

-après incubation, la lecture des résultats de la galerie API 20E, basé sur les tests biochimiques classiques et leur interprétation .

-Générer un code numérique à 7 chiffres et comparer avec la base de données API.

-Si trois tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

□ Test IND : ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

□ Test VP : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

□ Note : le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à trois :

Réincuber la galerie 24 heures (plus ou moins 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.




TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E						
Microtube	Substrat :	Caractère recherché	Révélateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Béta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de phénol	Lecture directe		
[CIT]	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Fe III	Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		 
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		Lecture indirecte		 
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte	 	 
[VP]	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)		Lecture indirecte		 
[GEL]	Gélatine	gélatinase	Particules de charbon	Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃ ⁻)	Nitrate réductase		Lecture indirecte		

Figure 11 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20E

5. Interprétation logicielle :

Des outils comme UPBM API Lab (<https://lab.upbm.org/>) analysent automatiquement le profil biochimique et obtenir efficacement l'identité dumicroorganisme avec son pourcentage d'identification (Debabza,2014). **La figure 12** ci-dessous montre le site en question .



Figure 12 : Photo de l'interface du logiciel UPBM Le Lab API.

Résultats et Discussions

1. Résultats et Discussions

1.1 .Isolement ,purification et conservation des souches :

1.1.1. Préparation et ensemencement des échantillons

Les échantillons ont été prélevés sur la plage de Sidi Abdelaziz (wilaya de Jijel), un site côtier caractérisé par sa biodiversité et son faible niveau de pollution anthropique. Afin de garantir l'asepsie, le prélèvement a été réalisé à l'aide de flacons et de tubes Falcon stériles, conservés à 4 °C et acheminés au laboratoire

dans les six heures suivant la collecte.

Les échantillons ont été soumis à une série de dilutions décimales successives (10^{-1} à 10^{-6}) dans de l'eau de mer stérile filtrée

Cette étape vise à :

- Réduire la densité bactérienne,
- Favoriser la séparation des colonies lors de l'ensemencement,
- Maximiser les chances d'obtenir des colonies isolées.
- L'ensemencement a été réalisé par étalement en surface (technique du spread plate) sur trois milieux gélosés non sélectifs : GN ,TSA et milieu marin naturel (MN) .

Les résultats de l'isolement des colonies bactériennes contenues dans notre échantillon d'eau marin sur les trois milieux utilisés sont mentionnés dans les **figures** ci-dessous (**13 ,14,15**) .

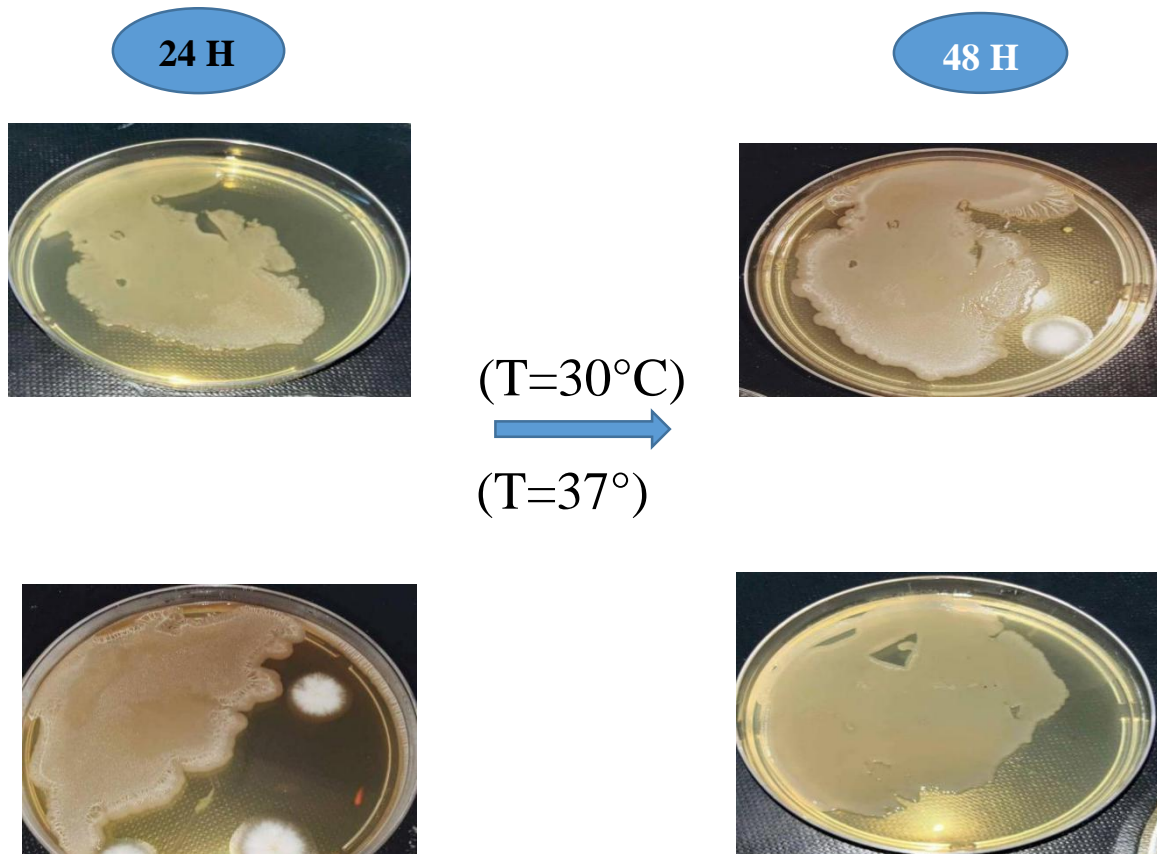


Figure 13 : Photo des colonies isolées sur le milieu TSA.

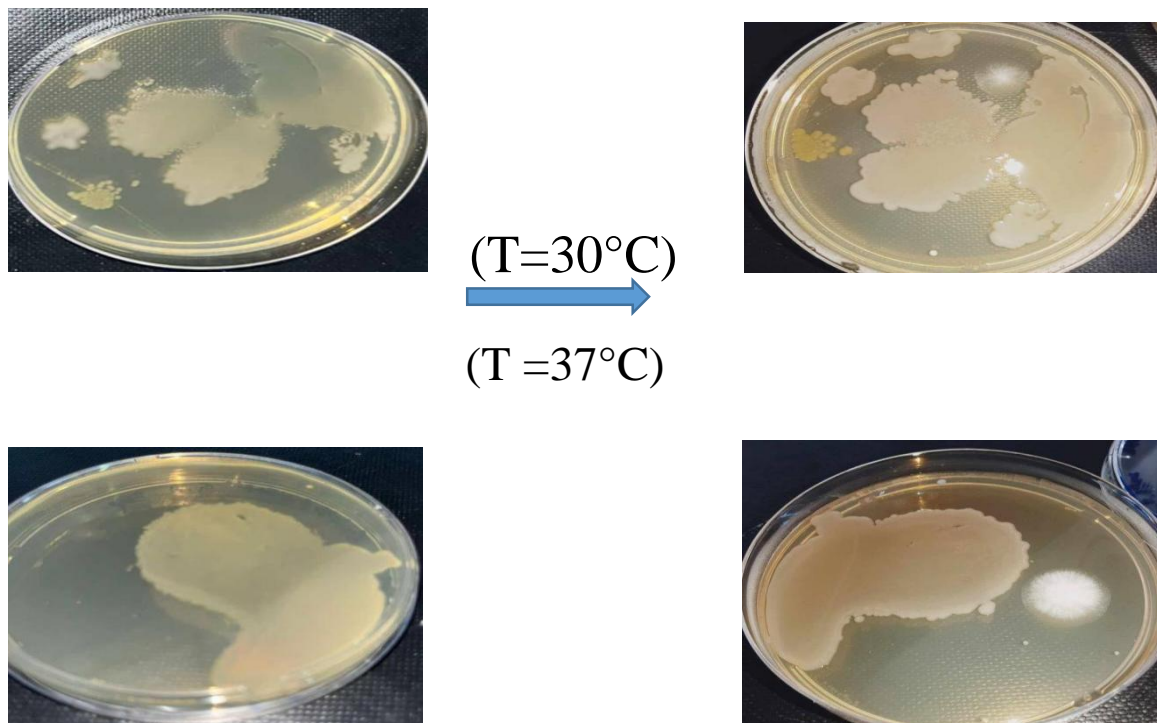


Figure 14 : Photo des colonies isolées sur le milieu GN.

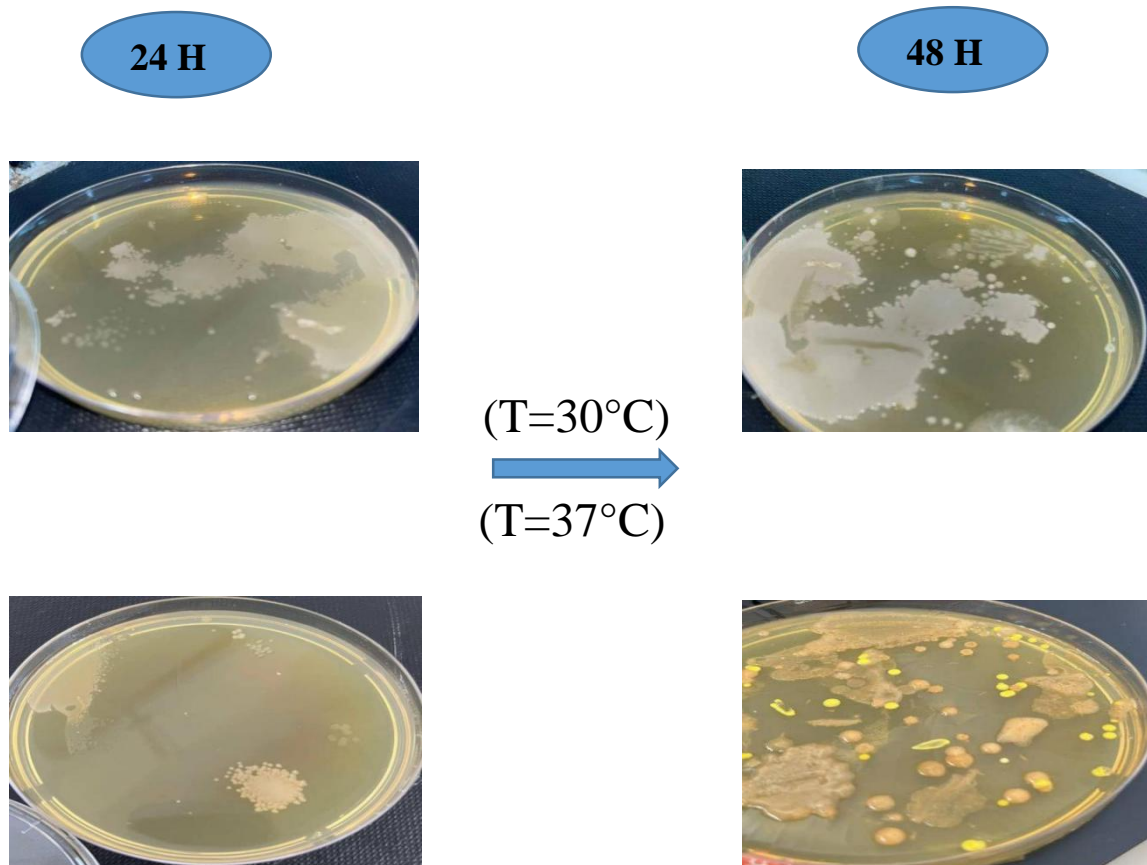


Figure 15 : Photo des colonies isolées sur le milieu naturelle MN

1.1.2. Conditions d'incubation

Les boîtes de Pétri ont été incubées dans une étuve à deux températures distinctes .

L'incubation a été effectuée en conditions aérobies pendant 24 à 48 heures. Une croissance bactérienne abondante a été observée dès 24 h, avec des différences nettes entre les milieux.

1.1.3. Purification des isolats

À partir des boîtes incubées, 16 souches bactériennes morphologiquement distinctes ont été sélectionnées sur la base des critères suivants :

- Forme de la colonie (circulaire, irrégulière),
- Taille (petite, moyenne, large),
- Couleur (blanc, jaune pâle, crème, translucide),
- Texture (crémeuse, mate),
- Aspect (Lisse et regueuse) .



La purification a été réalisée à l'aide de la technique des stries d'épuisement (quatre cadrants), répétée 2 à 3 fois jusqu'à l'obtention de colonies homogènes. Chaque souche a reçu un code alphanumérique (SA1 à SA16).





AVEC :


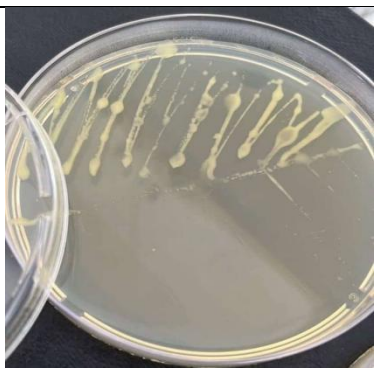
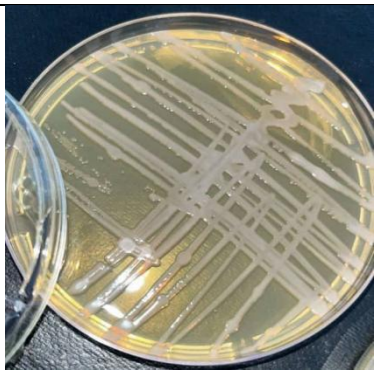
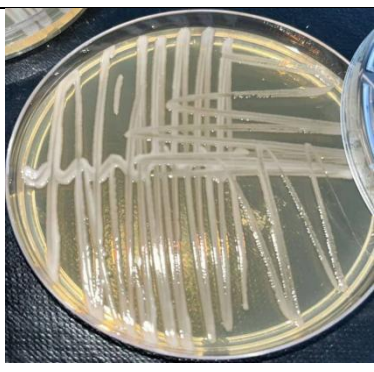
- (SA1 ,SA2) : Milieu=TSA ; T = 30°.
- (SA3 ,SA4) : Milieu=TSA ; T = 37°
- (SA5 ,SA6) : Milieu=GN ; T = 30°
- (SA7 ,SA8) : Milieu=GN ; T = 37°
- (SA9 ,SA10) : Milieu=MN ; T = 30°
- (SA11 ,SA16) : Milieu=MN ; T = 37°


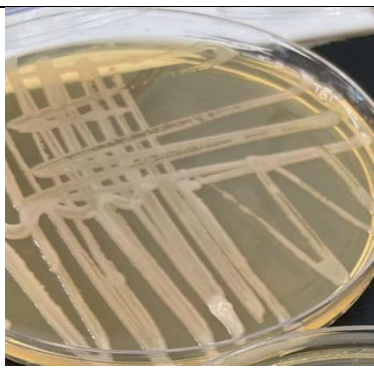
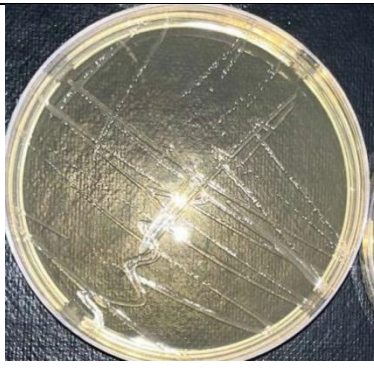

-Le Tableau ci-dessous montrent les résultats de la purification de quelques souches de nos bactéries (**Tableau 3**) .


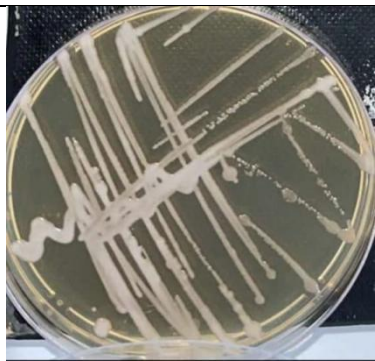
Tableau 3 : Les résultats de la purification .

Souche	Forme	Taille	Couleur	Texture, Aspect	Photographie
SA1	Irrégulière	Large	Crème	Crémeuse Rugueuse	
SA2	Circulaire	Petite	Translucide	Crémeuse Rugueuse	

SA3	Irrégulière	Large	Blanc	Crémeuse Rugueuse	
SA4	Irrégulière	Large	Jaune	Crémeuse Rugueuse	
SA5	Irrégulière	Large	Blanc	Crémeuse Lisse	
SA6	Circulaire	Petite	Jaune pâle	Crémeuse Lisse	

SA7	Irrégulière	Large	Blanc	Crémeuse Rugueuse	
SA8	Irrégulière	Large	Jaune pâle	Crémeuse Lisse	
SA9	Irrégulière	Petite	Translucide	Crémeuse Lisse	
SA10	Irrégulière	Moyenne	Blanc	Crémeuse Lisse	

SA11	Irrégulière	Moyenne	Crème	Crémeuse Lisse	
SA12	Irrégulière	Petite	Crème	Crémeuse Rugueuse	
SA13	Irrégulière	Petite	Translucide	Crémeuse Lisse	
SA14	Irrégulière	Petite	Translucide	Crémeuse Lisse	

SA15	Circulaire	Petite	Jaune pâle	Crémeuse Lisse	
SA16	Irrégulière	Petite	Crème	Crémeuse Lisse	

2. Observation des résultats de la coloration de Gram :

Après avoir effectué la coloration de Gram sur les 16 colonies bactériennes isolées à deux températures différentes (37° et 30°), l'observation microscopique a permis de différencier les types bactériens en fonction de la nature de leur paroi cellulaire. Les bactéries Gram positives sont apparues en violet, traduisant une paroi cellulaire épaisse riche en peptidoglycane, retenant le cristal violet. En revanche, les bactéries Gram négatives se sont colorées en rose, ce qui indique une paroi plus fine et la présence d'une membrane externe, ne retenant pas la coloration primaire. Cette étape a ainsi permis une première caractérisation morphologique et structurale des souches isolées.

Le tableau suivant (**Tableau 4**) présente la synthèse des résultats obtenus après la réalisation de la coloration de Gram sur les 16 souches bactériennes isolées. Il regroupe les informations principales observées au microscope, notamment la forme cellulaire et le type de paroi identifié. Ce tableau permet une lecture globale et comparative des caractéristiques morphologiques des isolats.

Tableau 4 : Résultats de la coloration de Gram pour les 16 souches bactériennes marines isolées.

Souche	Forme	Mode de regroupement	Gram (+)	Gram (-)
SA1	Cocco bacille	Isolée		×
SA2	Cocco bacille	En chaîne	×	
SA3	Cocco bacille	En chaîne		×
SA4	Cocco bacille	Isolée		×
SA5	Bacille	En chaîne		×
SA6	Cocco bacille	En chaîne		×
SA7	Bacille	En chaîne		×
SA8	Cocco bacille	En chaîne		×
SA9	Cocco bacille	Isolée		×
SA10	Cocci	En chaîne		×
SA11	Bacille	En chaîne		×
SA12	Cocci	Isolée		×
SA13	Cocco bacille	Isolée		×
SA14	Cocco bacille	En chaîne		×
SA15	Cocco bacille	En chaîne		×
SA16	Cocco bacille	Isolée		×

Afin d'illustrer ces observations, une photographie générale des lames colorées est présentée ci-après, montrant l'aspect macroscopique des échantillons après coloration, comme le montre la Figure 16.

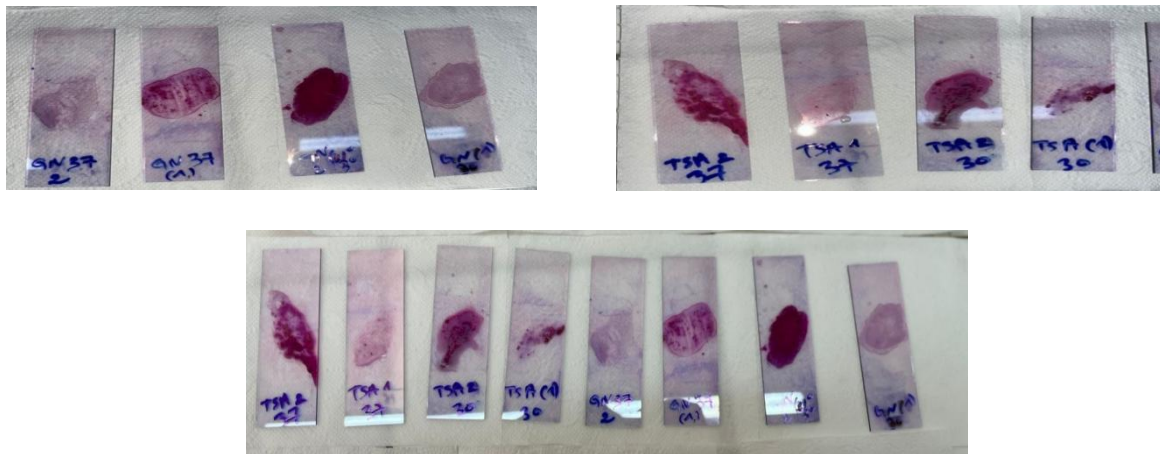
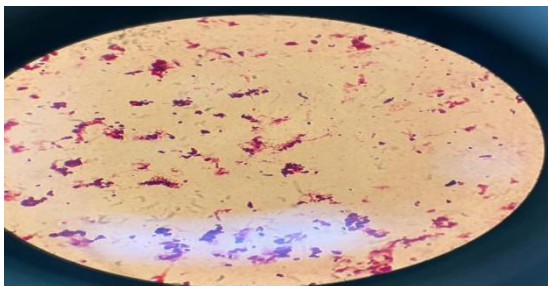
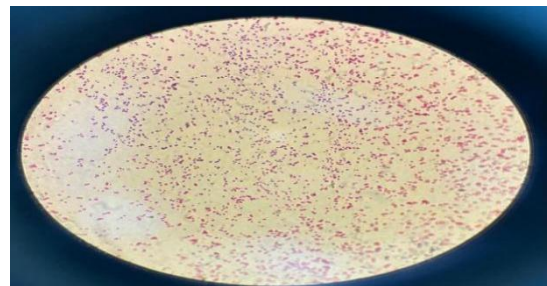


Figure 16 : Photographie générale montrant l'ensemble des lames colorées après coloration de Gram.

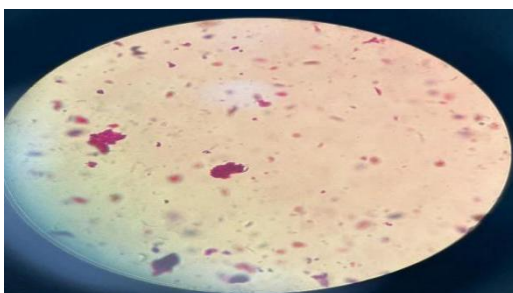
Enfin, des micrographies réalisées au microscope optique à immersion (objectif $\times 100$) permettent de visualiser en détail les formes cellulaires et la nature de la paroi bactérienne, confirmant les résultats obtenus par la méthode de Gram, comme illustré dans la Figure 17 ci-dessous.



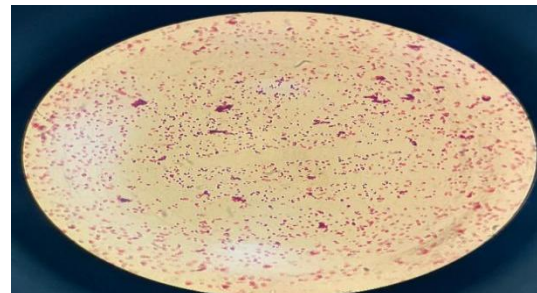
SA1



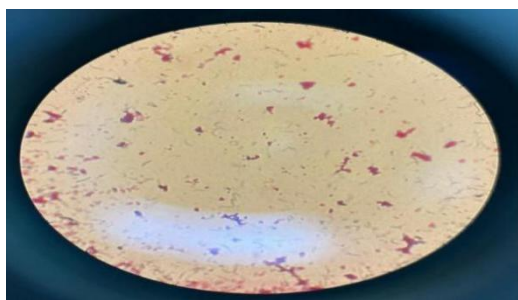
SA2



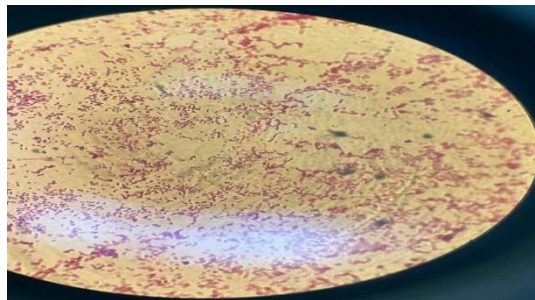
SA3



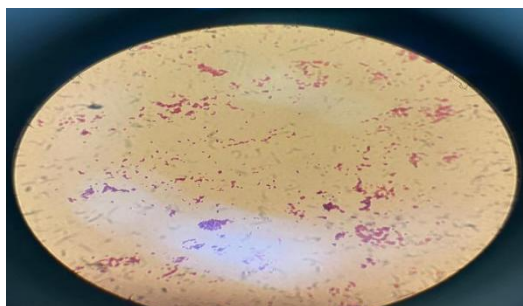
SA4



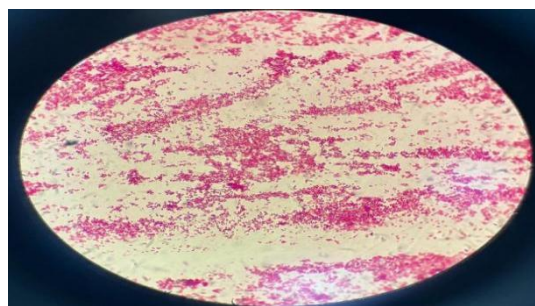
SA5



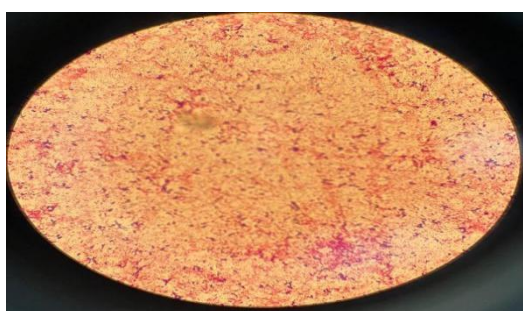
SA6



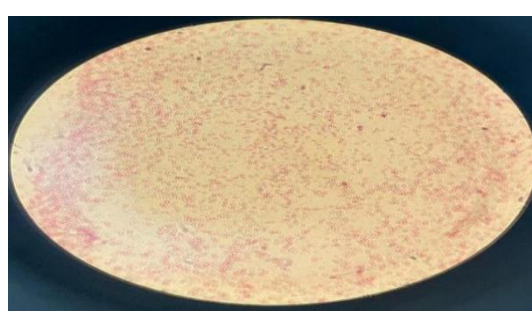
SA7



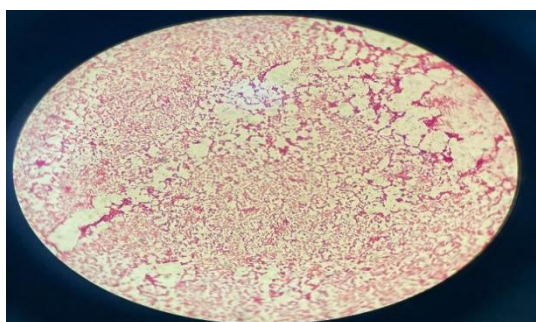
SA8



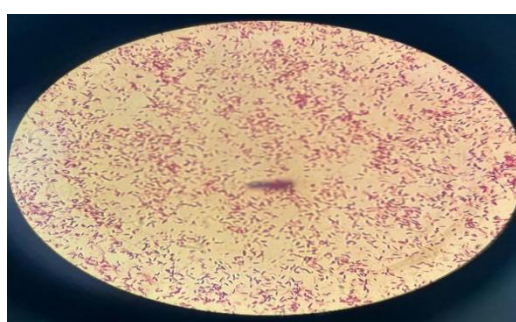
SA9



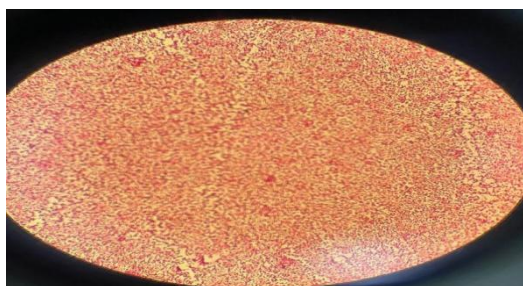
SA10



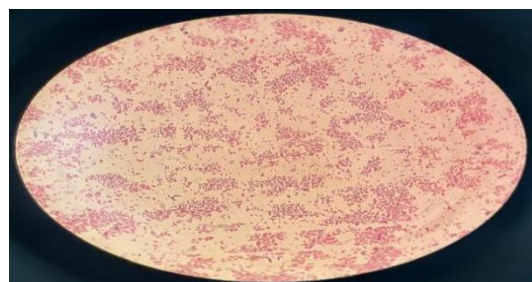
SA11



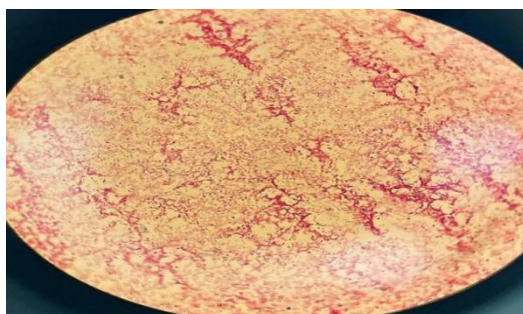
SA12



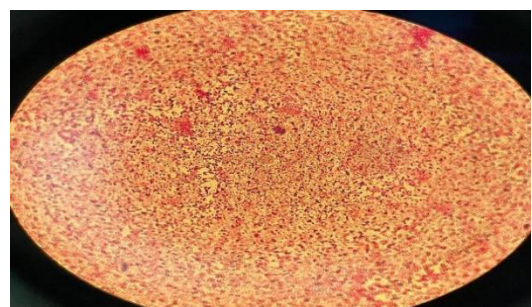
SA13



SA14



SA15



SA16

Figure 17 : Micrographies représentatives des 16 souches bactériennes isolées après coloration de Gram.

L'analyse morphologique, notamment par la coloration de Gram, a révélé une prédominance de bacilles Gram négatifs. Cette observation est cohérente avec la dominance des Protéobactéries dans les communautés marines superficielles (Bowman et al., 2007). Ces bactéries possédant une paroi cellulaire caractéristique. En effet, les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus fine, composée d'une couche mince de peptidoglycane entourée d'une membrane externe riche en lipopolysaccharides, ce qui leur confère une certaine protection et une perméabilité spécifique. À l'inverse, les bactéries à Gram positif, telles que les *Bacillus* marins identifiés dans notre étude, possèdent une paroi épaisse principalement constituée de peptidoglycane, renforcée par des acides téichoïques, ce qui leur confère rigidité et résistance aux stress environnementaux. Cette structure robuste explique leur capacité à produire des enzymes stables et tolérantes aux conditions extrêmes (zhang et al., 2015).

3. Détection des activités enzymatiques extracellulaires

Les résultats des tests d'activité enzymatique extracellulaire réalisés sur les souches isolées sont synthétisés dans les tableaux suivantes. Chaque souche a été évaluée pour sa capacité à produire des enzymes hydrolytiques spécifiques, en fonction du milieu de culture, de la température d'incubation et de la durée. Les observations ont été enregistrées sous forme de

présence ou d'absence de halo autour des colonies. n des activités enzymatiques extracellulaires.

3.1 Activité protéolytique

La production de protéases a été mise en évidence par la formation de halos de clarification autour des colonies cultivées sur milieux contenant du lait écrémé(GN/TSA). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant (**Tableau 5**) .

Tableau 5 : Activité protéolytique observées chez les souches bactériennes marines isolées.

Souche	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6	SA7	SA8
Lait écrémé	–	–	–	–	–	+	+	–

Légende :

+ : activité enzymatique observée (présence de halo)

– : aucune activité détectée

3.2 Activité amylolytique

L'activité amylolytique a été évaluée en observant la disparition de la coloration bleue à l'iode autour des colonies. Les résultats d'hydrolyse de l'amidon sont récapitulés ci-dessous. (**Tableau 6**)

Tableau 6 : Activité amylolytique observées chez les souches bactériennes marines isolées

Souche	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6	SA7	SA8
Amidon	–	–	+	+	+	+	–	–

3.3 Activité lipolytique

L'activité lipasique a été testée sur des milieux enrichis en Tween 80(GN/TSA/MN).La présence d'un halo opalescent ou fluorescent autour des colonies a permis de conclure à une hydrolyse lipidique. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant (**Tableau 7**)

Tableau 7 : Activité lipolytique des 16 souches bactériennes isolées .

Souche	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6	SA7	SA8
Twin80	–	–	–	–	–	–	–	–
Souche	SA9	SA10	SA11	SA12	SA13	SA14	SA15	S16
Twin80	–	–	–	–	–	+	–	+

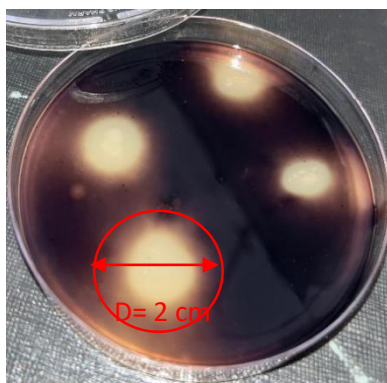
-Afin d'illustrer visuellement l'activité enzymatique détectée, des photographies représentatives des halos de lyse ou de clairance ont été prises pour certaines souches. Ces images confirment la présence de l'activité enzymatique et permettent une meilleure appréciation du diamètre, de la forme et de l'intensité de la réaction , comme le montre la **Figure 18**.



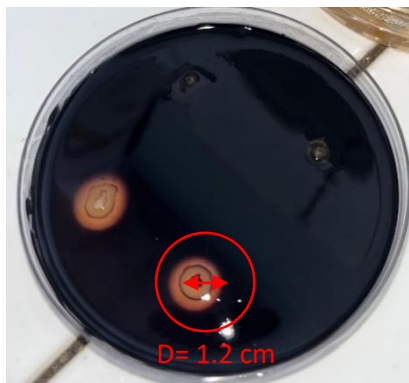
SA6



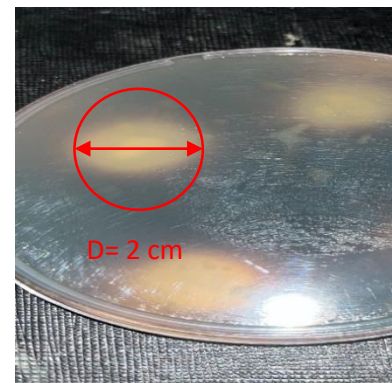
SA7



SA5



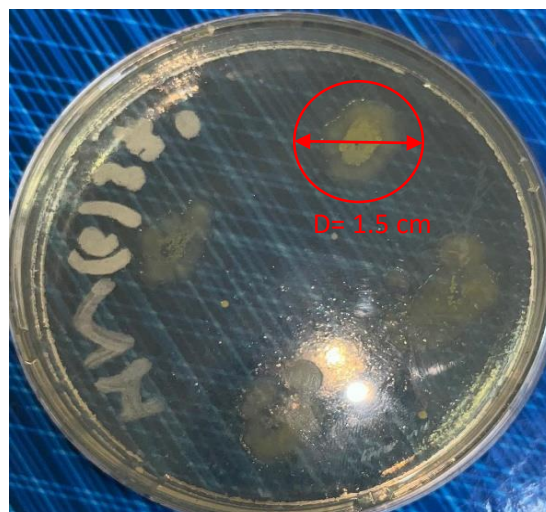
SA4



SA6



SA14



SA16

Figure 18 : :Halos clairs visibles autour des souches bactériennes ,révélant une activité enzymatique extracellulaire spécifique .

L'étude des enzymes extracellulaires produites par des souches bactériennes marines isolées a mis en lumière une diversité fonctionnelle notable. Sur un total de 16 souches examinées, 25 % ont démontré une activité protéolytique (tableau 5), visible par la formation de zones claires autour des colonies sur des milieux contenant du lait écrémé. Bien que ce pourcentage soit relativement faible, il souligne néanmoins le rôle important des bactéries marines en tant que producteurs de protéases, des enzymes largement utilisées dans les secteurs du cuir, des détergents et de l'agroalimentaire (Fulzele et *al.*, 2011) .

La moitié des isolats étudiés ont montré une activité amylolytique, ce qui constitue la proportion la plus élevée relevée dans cette recherche. Ce constat rejoint les observations précédentes qui mettent en avant la prévalence et le rôle écologique crucial des bactéries marines capables de décomposer l'amidon et d'autres polysaccharides complexes, contribuant ainsi de manière significative au cycle du carbone dans les écosystèmes marins (Drugs, 2015).

L'activité lipolytique a été détectée chez 12,5 % des souches étudiées, indiquant la présence de bactéries aptes à dégrader les lipides. Bien que cette activité soit moins répandue, elle présente un intérêt considérable pour la biotechnologie, notamment dans les domaines de la biorémédiation des hydrocarbures et des bioconversions industrielles (Tonova et Lazarova, 2008).

Les résultats obtenus dans cette étude mettent en évidence une grande diversité enzymatique, ce qui confirme que les bactéries marines constituent une source précieuse de biocatalyseurs possédant des caractéristiques uniques. Ces enzymes sont particulièrement adaptées pour fonctionner dans des environnements extrêmes.

4. Identification par galerie API 20 E :

L'utilisation du système d'identification API 20 E nous a permis de caractériser les principales propriétés biochimiques des six souches bactériennes.

Les résultats obtenus après la période d'incubation sont les suivants :

➤ Souche SA4

Tableau 8 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA4.

Tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL
Résultat	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Tests	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO ₂
Résultat	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+



Figure 19 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA4.

Les calculs proposent :

1. *Aeromonas hydrophila* gr.2 avec une probabilité de 96.6 % (excellente identification)

96.6%

2. Les taxons ayant une probabilité trop faible (< 5%) sont éliminés.

➤ Souche SA5

Tableau 9 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA5.

Tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL
Résultat	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Tests	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2
Résultat	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+



Figure 20 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA5

Les calculs proposent :

1. *Serratia liquefaciens* avec une probabilité de 100 % (excellente identification)

100%

2. Les taxons ayant une probabilité trop faible (< 5%) sont éliminés.

➤ Souche SA7

Tableau 10 : : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA7 .

Tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL
Résultat	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Tests	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2
Résultat	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+



Figure 21 :Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA7.

Les calculs proposent :

1. *Aeromonas hydrophila gr.1* avec une probabilité de 73.7 % (très bonne identification)

73.7%

2. *Aeromonas hydrophila gr.2* avec une probabilité de 26.3 % (bonne identification)

26.3%

3. Les taxons ayant une probabilité trop faible (< 5%) sont éliminés.

➤ Souche SA6

Tableau 11 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA6.

Tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL
Résultat	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Tests	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2
Résultat	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+



Figure 22 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA6.

Les calculs proposent :

1. *Aeromonas hydrophila gr.2* avec une probabilité de 77.8 % (excellente identification)

77.8%

2. *Aeromonas hydrophila gr.1* avec une probabilité de 22.2 % (mauvaise identification)

22.2%

3. Les taxons ayant une probabilité trop faible (< 5%) sont éliminés.

➤ Souche SA14

Tableau 12 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA14 .

Tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL
Résultat	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Tests	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2
Résultat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-



Figure 23 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA14 .

Les calculs proposent :

1. **Pantoea spp 2** avec une probabilité de 99.8 % (excellente identification)

99.8%

2. Les taxons ayant une probabilité trop faible (< 5%) sont éliminés.

➤ Souche SA16

Tableau 13 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA16.

Tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL
Résultat	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Tests	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO2
Résultat	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

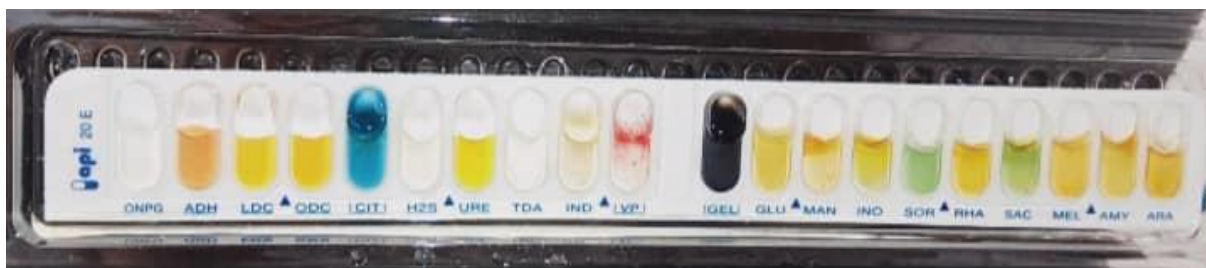


Figure 24 : Résultat de la galerie API 20 E de la souche SA16.

Les calculs proposent :

1. *Pantoea spp 2* avec une probabilité de 96.8 % (excellente identification)

96.8%

2. Les taxons ayant une probabilité trop faible (< 5%) sont éliminés.

Discussion

La caractérisation biochimique joue un rôle clé dans l'analyse des propriétés métaboliques et enzymatiques des bactéries isolées. Dans ce travail, six souches marines, préalablement sélectionnées pour leur production d'enzymes extracellulaires, ont été étudiées à l'aide de la galerie API 20 E. Ce système, largement utilisé pour identifier rapidement et précisément les bacilles à Gram négatif, combine des tests fermentatifs et enzymatiques afin d'établir un profil métabolique distinctif pour chaque microorganisme. L'interprétation des données a été réalisée via la plateforme UPBM API, un logiciel statistique spécialisé dans l'analyse phénotypique.

Résultats des identifications

Trois souches (SA4, SA6, SA7) ont été attribuées à *Aeromonas hydrophila* avec une probabilité supérieure à 70 %. Ce genre, fréquemment isolé en milieu aquatique, est réputé pour synthétiser des hydrolases (amylases, lipases, protéases), ce qui en fait un candidat prometteur pour des applications biotechnologiques, notamment grâce à sa stabilité enzymatique en conditions salines.

La souche SA5 a été identifiée sans ambiguïté (100 %) comme *Serratia liquefaciens*, un taxon connu pour ses activités gélatinolytiques et lipolytiques. Sa détection en environnement marin soulève des questions sur son origine écologique, potentiellement mixte (terrestre/marin). Enfin, les souches SA14 et SA16 ont été classées dans le genre *Pantoea spp.* avec des probabilités de 99,8 % et 96,8 %. Bien qu'associé aux écosystèmes végétaux, ce genre présente une halotolérance lui permettant de coloniser des niches marines. Leur profil enzymatique, marqué par des amylases et lipases, révèle un intérêt pour la valorisation industrielle.

L'exclusion automatique des taxons à probabilité inférieure à 5 % garantit la robustesse des identifications. Bien que l'API 20 E constitue une approche fiable pour l'étude fonctionnelle des souches, une analyse génétique complémentaire (séquençage de l'ARNr 16S) serait pertinente pour valider l'identité des isolats aux profils enzymatiques ambigus ou complexes.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude met en évidence la richesse et le potentiel biotechnologique des bactéries marines isolées à partir des échantillons prélevés sur la plage de Sidi Abdelaziz (Jijel). Ces résultats confirment que les environnements côtiers algériens, encore peu explorés, abritent une diversité bactérienne prometteuse pour des applications industrielles variées.

La combinaison des milieux GN, TSA et marin naturel (MN) a conduit à l'isolement de 16 souches distinctes, reflétant une biodiversité notable. Sélectionnés pour leur complémentarité nutritionnelle, ces substrats ont mis en évidence une diversité de bactéries

hétérotrophes. Les températures optimales de croissance (30°C et 37°C) suggèrent une prédominance de souches mésophiles présentant une certaine adaptabilité thermique. La purification des isolats, a permis d'obtenir 16 souches monospécifiques stables.

Conclusion

Au fil des dernières décennies, les enzymes d'origine microbienne se sont affirmées comme des éléments essentiels dans le domaine des biotechnologies contemporaines, grâce à leur efficacité, leur spécificité et leur capacité d'adaptation aux procédés industriels. Ces biocatalyseurs naturels jouent un rôle clé dans divers secteurs, notamment l'agroalimentaire, la pharmacie, la formulation de détergents et la biorémediation. Leur importance économique est en constante augmentation, avec un marché mondial des enzymes qui atteint aujourd'hui plusieurs milliards de dollars. Cependant, la majorité des enzymes exploitées proviennent encore d'un nombre restreint de microorganismes connus, laissant entrevoir un vaste potentiel inexploité dans les environnements naturels.

Les milieux marins, couvrant plus de 70 % de la surface de la Terre, hébergent une biodiversité microbienne remarquable, souvent adaptée à des conditions extrêmes telles que la salinité, la pression ou la température. Les bactéries marines, en particulier, sont réputées pour leur aptitude à produire des enzymes stables et actives dans ces environnements difficiles. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude, qui a consisté à isoler, purifier et caractériser des souches bactériennes marines prélevées sur la plage de Sidi Abdelaziz, afin d'évaluer leur potentiel enzymatique.

À travers différentes étapes expérimentales, allant de l'ensemencement à l'identification biochimique, nous avons mis en lumière une diversité bactérienne notable, capable de synthétiser des enzymes extracellulaires telles que des protéases, amylases et lipases. Ce travail apporte une contribution modeste mais concrète à la connaissance de la microflore marine algérienne et à l'exploration de ses applications biotechnologiques. Il souligne également l'importance de poursuivre le dépistage de souches microbiennes encore peu étudiées, notamment dans des niches écologiques comme les milieux marins, afin de découvrir de nouveaux catalyseurs naturels présentant un intérêt industriel.

Les Références Bibliographiques

Les Références

- Amrani, A., 2015. Adaptation à la pression hydrostatique chez les bactéries sulfato-réductrices piézophiles du genre *Desulfovibrio* (thesis). Aix-Marseille.
- Azam, Malfatti, 2007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17853906/> - Search Results. PubMed.
- Bagheri, M., 2015. Cationic Antimicrobial Peptides (AMPs): Thermodynamic Characterization of Peptide–Lipid Interactions and Biological Efficacy of Surface-Tethered Peptides. *ChemistryOpen* 4, 389–393. <https://doi.org/10.1002/open.201402149>
- Berg, J.M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., Stryer, L., 2019. Stryer Biochimie | SpringerLink. URL <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-54620-8> (accessed 5.13.25).
- Bisswanger, H., 2014. IUBMB Nomenclature Home Page . URL <https://iubmb.qmul.ac.uk/>
- Bonnet, M., Lagier, J.C., Raoult, D., Khelaifia, S., 2019. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect.* 100622.
- Bourne, 2016. 404 Page not found. ResearchGate.
- Bowman, Burke, Bissett, 2007. Bacterial community shifts in organically perturbed sediments - Bissett - 2007 - Environmental Microbiology - Wiley Online Library. URL <https://enviromicro-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2006.01110.x>
- Bris, N.L., 2019. Les sources hydrothermales, des « jardins de roses » au fond des océans . Purlascience.fr.URL<https://www.purlascience.fr/sd/biologie-marine/https://www.purlascience.fr/sd/biologie-marine/des-roses-tapis-au-fond-des-mers-17504.php> (accessed 5.17.25).
- Caviccholi, R., Ripple, W. j., Timmis, K., Azam, F., Bakken, L.R., Baylis, M., Michael J, Orphan, V.J., H, J.B., 2019. Scientists’ warning to humanity: microorganisms and climate change | Nature Reviews Microbiology. URL <https://www.nature.com/articles/s41579-019-0222-5> (accessed 5.12.25).
- Chatterjee, S., Kumari, S., Rath, S., Das, S., 2022. Chapter 1 - Prospects and scope of microbial bioremediation for the restoration of the contaminated sites, in: Das, S., Dash, H.R. (Eds.), *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (Second Edition). Elsevier, pp. 3–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85455-9.00011-4>
- Clarke P.H., Steel K.J. (1966). Rapide and simple biochemical tests for bacterial identification. Academic press. London. pp. 111.
- Coquelle, N., 2008. Mécanismes moléculaires d’adaptation aux conditions physico-chimiques extrêmes dans la famille des lactate-malate déshydrogénases (These de doctorat). Université Joseph Fourier (Grenoble, Isère, France ; 1971-2015).
- Corinaldesi, C., 2015. New perspectives in benthic deep-sea microbial ecology. *Front. Mar. Sci.* 2. <https://doi.org/10.3389/fmars.2015.00017>
- Dalmaso, G.Z.L., Ferreira, D., Vermelho, A.B., 2015a. Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. *Mar. Drugs* 13, 1925. <https://doi.org/10.3390/md13041925>
- Dang, Lovell, 2000. Bacterial Primary Colonization and Early Succession on Surfaces in Marine Waters as Determined by Amplified rRNA Gene Restriction Analysis and Sequence Analysis of 16S rRNA Genes | Applied and Environmental Microbiology.
- Debabza M. 2015. Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire. Thèse de doctorat d’état, Université Badji Mokhtar-Annaba, pp. 5-60-61-62-63-64-65.

- Debashish, G., Malay, S., Barindra, S., Joydeep, M., 2005. Marine enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 96, 189–218. <https://doi.org/10.1007/b135785>
- Demirkan, 2011. TÜBİTAK Academic Journals | TÜBİTAK Research. URL <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/abstract.htm?id=11940> (accessed 5.14.25).
- De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 ed., The Firmicute. Springer. New York. Volume Three. 63-67.
- Dick, G.J., 2019. The microbiomes of deep-sea hydrothermal vents: distributed globally, shaped locally | *Nature Reviews Microbiology*. URL <https://www.nature.com/articles/s41579-019-0160-2> (accessed 5.12.25).
- Drugs, 2015. Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications - PMC . URL <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4413194/>
- Dutta, Ray, 2009. Production and Characterization of an Alkaline Thermostable Crude Lipase from an Isolated Strain of *Bacillus cereus* C7 | *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Enez, B., 2020. Isolation and Identification of *Bacillus* sp. from Root Soil of the *Astragalus gummifer* Lab.: Obtaining and Characterization of α -Amylase. *Adiyaman Univ. J. Sci.* 10, 29–39. <https://doi.org/10.37094/adyujsci.680580>
- Enzyme classification, illustration – acheter une photo – 14247452 | Science Photo Library. URL <https://www.sciencephoto.fr/image/14247452-Enzyme-classification-illustration> (accessed 5.16.25).
- Fulzele, R., DeSa, E., Yadav, A., Shouche, Y., Bhadekar, R., 2011. Characterization of novel extracellular protease produced by marine bacterial isolate from the Indian Ocean. *Braz. J. Microbiol.* 42, 1364–1373. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110004000018>
- Guézennec, J, Quéréllou, J, 2023. Biotechnologie des extrémophiles : Applications biotechnologiques | *Techniques de l'Ingénieur*. URL <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/concepts-equipements-et-biosecurite-42164210/biotechnologie-des-extremophiles-bio580/applications-biotechnologiques-bio580niv10003.html> (accessed 5.13.25).
- Guilherme silva, Simone Penafirme, Ricardo Tadeu Lopes, Mirian Craper, 2017. 3D μ CT image of natural biofilm (Purple) isolated from marine sediment... | Download Scientific Diagram.
- Henner Brinkmann, Jorg Overmann, Pascal Bartling, Boyke Bunk, 2020. *Frontiers | The Composite 259-kb Plasmid of Martellella mediterranea DSM 17316T—A Natural Replicon with Functional RepABC Modules from Rhodobacteraceae and Rhizobiaceae.* URL <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.01787/full> (accessed 5.13.25).
- Harrigan W.F. & McCance M.E. (1976). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic press. London. P. 21-277.
- IUBMB Nomenclature Home Page, 2021. . Nomencl. Comm. IUBMB. URL <https://iubmb.qmul.ac.uk/> (accessed 5.13.25).
- Jill E Clarridge, I.I.I., 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 840. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Joint, I., Mühling, M., Querellou, J., 2010a. Culturing marine bacteria – an essential prerequisite for biodiscovery. *Microb. Biotechnol.* 3, 564–575. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00188.x>
- Joseph, B., Ramteke, P.W., Thomas, G., 2008. Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnol. Adv.* 457–470.

- Khlif, M., Sellami, A., Sellami, H., Makni, F., Ayadi, A., 2011. *Candida dubliniensis* : méthodes d'identification et implications épidémiologiques. *Pathol. Biol.* 59, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.09.011>
- Koneman, W., Allen, S., D., Janda, W., M., Schreckenberger, P., Winn, W., 2006. Hacker techniques, tools, and incident handling | WorldCat.org .
- Les biotechnologies marines ou biotechnologies bleues en France | Dossier, n.d. URL <https://www.futura-sciences.com/tech/dossiers/technologie-biotechnologies-defi-futur-2158/page/6/> (accessed 5.16.25).
- Licciano, M., Terlizzi, A., Giangrande, A., Cavallo, R.A., Stabili, L., 2007a. Filter-feeder macroinvertebrates as key players in culturable bacteria biodiversity control: A case of study with *Sabella spallanzanii* (Polychaeta: Sabellidae). *Mar. Environ. Res.* 64, 504–513. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2007.04.004>
- Lüthi, D., Le Floch, M., Bereiter, B., Blunier, T., Barnola, J.-M., Siegenthaler, U., Raynaud, D., Jouzel, J., Fischer, H., Kawamura, K., Stocker, T.F., 2008. High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present. *Nature* 453, 379–382. <https://doi.org/10.1038/nature06949>
- Makarova, K.S., Aravind, L., Wolf, Y.I., Tatusov, R.L., Minton, K.W., Koonin, E.V., Daly, M.J., 2001. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 65, 44–79. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.44-79.2001>
- Martens, Nealson, 2007. The *Rhizobium etli* opt operon is required for symbiosis and stress resistance - Vos - 2007 - Environmental Microbiology - Wiley Online Library. URL <https://enviromicro-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2007.01284.x> (accessed 5.12.25).
- Martínez, A.T., Ruiz-Dueñas, F.J., Camarero, S., Serrano, A., Linde, D., Lund, H., Vind, J., Tovborg, M., Herold-Majumdar, O.M., Hofrichter, M., Liers, C., Ullrich, R., Scheibner, K., Sannia, G., Piscitelli, A., Pezzella, C., Sener, M.E., Kılıç, S., van Berkel, W.J.H., Guallar, V., Lucas, M.F., Zuhse, R., Ludwig, R., Hollmann, F., Fernández-Fueyo, E., Record, E., Faulds, C.B., Tortajada, M., Winckelmann, I., Rasmussen, J.-A., Gelo-Pujic, M., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Rencoret, J., Alcalde, M., 2017. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnol. Adv.* 35, 815–831. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.06.003>
- M.C Austen, J.P. Atkins, D. Burdon, S. Degraer, S. Deros, T. Horton, D.J. Starkey, M. Townsend, T. Zarzycki, 2007. Identification, definition and quantification of goods and services provided by marine biodiversity: Implications for the ecosystem approach - ScienceDirect. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025326X06005200> (accessed 5.14.25).
- Minic, Z., Serre, V., Hervé, G., 2006. Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *C. R. Biol.* 329, 527–540. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2006.02.001>
- Modha, S.G., Pöthig, A., Dreuw, A., Bach, T., 2019. [6π] Photocyclization to cis-Hexahydrocarbazol-4-ones: Substrate Modification, Mechanism, and Scope. *J. Org. Chem.* 84, 1139–1153. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b03144>
- Nelson, Cox., 2017. IUBMB Nomenclature Home Page. Oger, P., Cario, A., 2014. La vie sous pression des microorganismes piézophiles. *Biol. Aujourd'hui* 208, 193–206. <https://doi.org/10.1051/jbio/2014023>
- ong-Jian Ding, Zeng-Ru Wang, Chen-Yu Li, 2021. Page not found | ScienceDirect. URL (accessed 5.14.25).

- Oren, 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications | Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology | Oxford Academic. URL <https://academic.oup.com/jimb/article/28/1/56/5989526> (accessed 5.14.25).
- Poli, A., Finore, I., Romano, I., Gioiello, A., Lama, L., Nicolaus, B., 2017. Microbial Diversity in Extreme Marine Habitats and Their Biomolecules. *Microorganisms* 5, 25. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020025>
- Rampelotto, 2013. Extremophiles and Extreme Environments. URL <https://www.mdpi.com/2075-1729/3/3/482> (accessed 5.12.25).
- Rao, M. B, Tanksale, A. M, Ghatge, M. S, Deshpande, V. V, 2013. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases | Microbiology and Molecular Biology Reviews. URL <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mmbr.62.3.597-635.1998> (accessed 5.13.25).
- Rothschild, L.J., Mancinelli, R.L., 2001. Life in extreme environments. *Nature* 409, 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/35059215>
- Ronald K.S., Harold S.L. (1970). Methods for the isolation of proteolytic marine bacteria. *Appl. Microbiol.* 20 : 991-992. In : Shivanand P., Jayaraman G. (2009). Production of extracellular protease from halotolerant bacterium *Bacillus aquimaris* VTTP4 isolated from kumta coast. *Process Biochem.* 44 : 1088-1094.
- Saker, R., 2018. Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes (Thesis).
- Salton, M.R.J., Kim, K.-S., 1996. Structure, in: Baron, S. (Ed.), *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).
- Sauka, D.H., Monella, R.H., Benintende, G.B., 2010. Detection of the mosquitocidal toxin genes encoding Cry11 proteins from *Bacillus thuringiensis* using a novel PCR-RFLP method. *Rev. Argent. Microbiol.* 42, 23–26. <https://doi.org/10.1590/S0325-75412010000100005>
- Smith n R., Gordon R.E., Clark F.E. (1952). Aerobic spores-forming bacteria. *J. Appl. Bact.* 27 : 78-99.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark Welch, D., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., Herndl, G.J., 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12115–12120. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605127103>
- te Velthuis, A.J.W., Fodor, E., 2016. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 479–493. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87>
- Tatsinkou F.B., Taveai F. and Ndjouenkeui R. (2005). Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of biotechnology*, 4(1), P: 14-18.
- Thompson, Tetsuya Iida, Swings, 2004. Biodiversity of Vibrios | Microbiology and Molecular Biology Reviews . URL <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mmbr.68.3.403-431.2004> (accessed 6.2.25).
- Tonova, K., Lazarova, Z., 2008. Reversed micelle solvents as tools of enzyme purification and enzyme-catalyzed conversion. *Biotechnol. Adv.* 26, 516–532. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.06.002>
- Trincone, 2011. MDPI | Error 404 File not found. URL <https://www.mdpi.com/1660-3397/9/9/478> (accessed 5.12.25).

- Trincone, A., 2011. Marine Biocatalysts: Enzymatic Features and Applications. *Mar. Drugs* 9, 478–499. <https://doi.org/10.3390/md9040478>
- Trincone, Antonio, 2011. Marine Biocatalysts: Enzymatic Features and Applications [WWW Document]. URL <https://www.mdpi.com/1660-3397/9/4/478> (accessed 5.18.25).
- Université de Aïn Témouchent, 2021. URL <https://dspace.univ-temouchent.edu.dz/bitstream/123456789/2154/1/Isolement%20et%20Identification%20des%20Souches%20Bact%C3%A9riennes%20Productrices%20des%20Enzymes%20%C3%A0%20Int%C3%A9r%C3%AAt%20Industriel.pdf>
- Verneuil, N., Breton, Y.L., Hartke, A., Auffray, Y., Giard, J.-C., 2004. Identification of a new oxidative stress transcriptional regulator in *Enterococcus faecalis*. *Le Lait* 84, 69–76. <https://doi.org/10.1051/lait:2003039>
- Vidic, J., Auger, S., 2019. Techniques moléculaires de détection de bactéries d'origine alimentaire : Dossier complet | Techniques de l'Ingénieur. URL <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/analyse-biocapteurs-et-technologies-omiques-42160210/techniques-moleculaires-de-detection-de-bacteries-d-origine-alimentaire-re281/> (accessed 5.12.25).
- Vieille, Zeikus, 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability | Microbiology and Molecular Biology Reviews. URL <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mmbr.65.1.1-43.2001> (accessed 5.14.25).
- Vos, K., Braeken, K., Fauvart, M., Ndayizeye, M., Verhaert, J., Zachurzok, S., Lambrechts, I., Michiels, J., 2007a. The *Rhizobium etli* opt operon is required for symbiosis and stress resistance. *Environ. Microbiol.* 9, 1665–1674. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01284.x>
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N., 2007. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.04.006>
- Yang, J.-P., Fan, W., Rogers, C., Chatterton, J.E., Bliesath, J., Liu, G., Ke, N., Wang, C.-Y., Rhoades, K., Wong-Staal, F., Li, Q.-X., 2006. A novel RNAi library based on partially randomized consensus sequences of nuclear receptors: identifying the receptors involved in amyloid beta degradation. *Genomics* 88, 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.03.010>
- Yuan, Z., Nag, R., Cummins, E., 2022. Human health concerns regarding microplastics in the aquatic environment - From marine to food systems. *Sci. Total Environ.* 823, 153730. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153730>
- Zhang, C., Kim, S.-K., 2010a. Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. *Mar. Drugs* 8, 1920–1934. <https://doi.org/10.3390/md8061920>
- zhang, Tong Si, Han Xiao, 2015. Rapid prototyping of microbial cell factories via genome-scale engineerine -ScienceDirect.URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975014001827?via%3Dihub> (accessed 6.2.25).
- Zhou, M.-Y., Chen, X.-L., Zhao, H.-L., Dang, H.-Y., Luan, X.-W., Zhang, X.-Y., He, H.-L., Zhou, B.-C., Zhang, Y.-Z., 2009. Diversity of Both the Cultivable Protease-Producing Bacteria and Their Extracellular Proteases in the Sediments of the South China Sea. *Microb. Ecol.* 58, 582–590. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9506-z>

Les Annexes

Matériels

- Autoclave (WEBECO Allemagne)
- Etuve (BINDER Allemagne)
- Bain marie (MEMMERT Allemagne)
- Agitateur chauffant a barreau magnétique (GARHARDT Allemagne)
- Balance (KERN 770 Allemagne)
- Réfrigérateur (ENIEM Algérie)
- Microscope photonique
- Bec bunsen
- Boîtes Pétri
- Pipettes Pasteur
- Erlenmeyer
- Eprouvette
- Flacons en verre
- Tubes à essai en verre

Année universitaire :2024/2025	Présenté par : Meghlaoui Hadjer Bouchrikha Darine
Essai d'isolement des bactéries marines productrices d'enzymes à partir du littoral de Sidi Abdelaziz,wilaya de (Jijel).	
Mémoire pour l'obtenir du diplôme de Master en Biotechnologie et Biothérapie	
<p>RESUME</p> <p>Dans le cadre de la valorisation des ressources microbiologiques marines, ce travail s'est concentré sur l'isolement et la caractérisation de bactéries marines productrices d'enzymes hydrolytiques. Ces micro-organismes, adaptés aux milieux salins, constituent une source précieuse d'enzymes stables et efficaces dans des conditions environnementales extrêmes.</p> <p>Des prélèvements d'eau et de sédiments ont été réalisés sur le littoral de Sidi Abdelaziz (Jijel), puis ensemencés sur différents milieux de culture (gélose nutritive, TSA et milieu marin naturel). Seize souches bactériennes ont été isolées, purifiées et analysées morphologiquement (macroscopie, microscopie, coloration de Gram) et testés pour la production d'enzymes (protéases, amylases, lipases).</p> <p>Les résultats ont révélé que plusieurs de ces souches présentent une activité enzymatique significative, notamment amylolytique. L'identification biochimique à l'aide de la galerie API 20 E a permis de relier certaines souches à des genres marins connus.</p> <p>Mots-clés : Bactérie Marines, Enzymes hydrolytique , Isolement bactérien ,Activité enzymatique,Galerie API 20 E .</p>	
Laboratoire de Recherche : Laboratoire de microbiologie générale (UFM Constantine 1) .	
<p>Président du jury: Pr. Bellil Ines (Pr- Université Frères Mentouri,Constantine 1)</p> <p>Encadrant : Dr. Adjerooud Moussa (MCA- Université Frères Mentouri,Constantine</p> <p>Examinatrice : Dr.Baali Nacera (MCA- Université Frères Mentouri,Constantine 1)</p>	